

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Eva Tajovská

**Biochemická charakterizace modelového zástupce hemových  
senzorových proteinů**

Biochemical characterization of a model heme sensor protein

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 9. května 2020

## **Poděkování**

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady, ochotu, čas a pomoc, kterou mi při zpracování bakalářské práce poskytla. Můj velký dík patří také RNDr. Alžbětě Lengálové za poskytnutou pomoc, trpělivost a čas strávený při řešení experimentální části této bakalářské práce.

## Abstrakt

Hemoproteiny plní v živém organismu mnoho důležitých rolí. Jednou takovou úlohou je senzorová funkce. Senzorové proteiny, které detekují hem, jsou schopny rozpoznat měnící se koncentraci hemu v daném organismu. Jako signální molekula v případě těchto proteinů slouží samotný hem. Senzorové proteiny, které detekují změny v koncentraci plynů, využívají jako signální molekulu právě biatomickou molekulu plynu. K zahájení přenosu signálu v případě těchto senzorových proteinů dochází po navázání molekuly plynu na molekulu hemu, která je pevně navázána k senzorové doméně proteinu. Oba typy signalizace regulují řadu fyziologických procesů prokaryotických i eukaryotických organismů.

V teoretické části této bakalářské práce je uveden souhrn dosavadních poznatků vědeckých studií, které se zabývají hemovými senzorovými proteiny. Experimentální část této práce se zabývá vlastnostmi konkrétního modelového senzorového hemoproteinu. Jedná se o hemoprotein *EcDOS*, který detekuje kyslík. Dále se tato práce věnuje zkrácené formě tohoto proteinu, izolované senzorové doméně s PAS strukturou (*EcDOS*-PAS). Úkolem experimentální části této práce bylo oba zmíněné proteiny exprimovat a izolovat z buněk *E. coli* BL-21 (DE3). Nakonec byly proteiny *EcDOS* i *EcDOS*-PAS předběžně charakterizovány a byly porovnány jejich vlastnosti. Výtěžek proteinu *EcDOS*-PAS byl několikanásobně vyšší než výtěžek proteinu *EcDOS*. Čistota izolovaného preparátu *EcDOS* se pohybovala okolo 85–90 %, zatímco čistota finálního preparátu *EcDOS*-PAS činila 99 %. Soretovy pásy a Q-pásy  $\alpha$  a  $\beta$  absorpčních spekter proteinů *EcDOS* i *EcDOS*-PAS v UV/VIS oblasti byly nalezeny při podobných hodnotách vlnových délek.

Klíčová slova: hem, hemové senzorové proteiny, kyslíkový senzor, přenos signálu

## Abstract

Hemoproteins play a lot of important roles within the living organism. One of these being the sensor function – heme sensor proteins are able to detect the changing concentration of heme in organisms. Heme itself serves as a signalling molecule for these proteins. Heme-based gas sensor proteins use a biatomic gas molecule as a signalling molecule. Signal transduction begins once the gas molecule is bound to the heme molecule which is already tightly bound in the protein sensing domain. Both these types of signalling regulate a number of physiological processes in the prokaryotic and eukaryotic organisms.

The theoretical part of the bachelor thesis summarizes recent scientific studies on heme sensor proteins, while the experimental part focuses on the properties of a specific model sensor hemoprotein. A direct oxygen sensor from *E. coli* (*EcDOS*) was selected as a model protein. Furthermore, the thesis deals with a truncated form of the *EcDOS* protein, an isolated sensor domain with a PAS structure (*EcDOS*-PAS). The experimental part aimed at expressing and isolating of both mentioned proteins from *E. coli* BL-21 (DE3) cells. Finally, both the *EcDOS* and *EcDOS*-PAS proteins were preliminarily characterised and their properties compared. The yield of the *EcDOS*-PAS was several times higher than the yield of the *EcDOS*. The purity of the isolated *EcDOS* protein preparation was approximately 85–90 %, while the purity of the final *EcDOS*-PAS protein preparation was 99 %. The Soret bands and Q-bands  $\alpha$  and  $\beta$  of the absorption spectra of the *EcDOS* and the *EcDOS*-PAS proteins in the UV/VIS region were found at similar wavelength values.

Key words: heme, heme sensor proteins, oxygen sensors, signal transduction

[IN CZECH]

## Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů .....	8
1 Úvod .....	12
2 Literární přehled .....	13
2.1 Charakteristika hemoproteinů .....	13
2.2 Sensorové proteiny, které detekují hem .....	16
2.2.1 Specifické znaky sensorových proteinů, které detekují hem .....	17
2.2.2 Zástupce sensorových proteinů, které detekují hem – hemem regulovaný inhibitor .....	21
2.3 Sensorové proteiny, které detekují plyny .....	22
2.3.1 Sensorové proteiny, které detekují kyslík .....	23
2.3.1.1 Kyslíkové senzory s GAF doménou .....	24
2.3.1.2 Kyslíkové senzory s globinovou doménou .....	26
2.3.1.3 Kyslíkové senzory s PAS doménou .....	28
2.3.1.3.1 Fosfodiesterasa <i>EcDOS</i> ( <i>EcDosP</i> ) .....	30
2.4 Využití plasmidu pET-28a(+) pro expresi rekombinantních proteinů .....	33
3 Cíle bakalářské práce .....	35
4 Přístroje, materiál a použité metody .....	36
4.1 Použité přístroje .....	36
4.2 Použitý materiál a chemikálie .....	37
4.3 Použité metody .....	38
4.3.1 Příprava médií a pracovních roztoků .....	38
4.3.1.1 Příprava roztoku kanamycinu .....	38
4.3.1.2 Příprava LB média .....	38
4.3.1.3 Příprava TB média .....	38
4.3.2 Příprava agarových ploten .....	38

4.3.3 Transformace buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3) plasmidem pET-28a(+)/ <i>EcDOS</i> nebo plasmidem pET-28a(+)/ <i>EcDOS</i> -PAS.....	39
4.3.3.1 Transformace buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3) plasmidem pET-28a(+)/ <i>EcDOS</i> nebo plasmidem pET-28a(+)/ <i>EcDOS</i> -PAS bez teplotního šoku .....	39
4.3.3.2 Transformace buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3) plasmidem pET-28a(+)/ <i>EcDOS</i> nebo pET-28a(+)/ <i>EcDOS</i> -PAS teplotním šokem .....	40
4.3.4 Exprese proteinu <i>EcDOS</i> nebo proteinu <i>EcDOS</i> -PAS v kompetentních buňkách <i>E. coli</i> BL-21 (DE3).....	40
4.3.5 Izolace proteinu <i>EcDOS</i> nebo proteinu <i>EcDOS</i> -PAS z buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3).....	41
4.3.6 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu <i>EcDOS</i> nebo proteinu <i>EcDOS</i> -PAS v roztoku .....	43
4.3.7 Spektrofotometrická charakterizace proteinů <i>EcDOS</i> a <i>EcDOS</i> -PAS.....	44
4.3.8 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) .....	45
5 Výsledky.....	48
5.1 Exprese proteinů <i>EcDOS</i> a <i>EcDOS</i> -PAS .....	48
5.1.1 Exprese proteinu <i>EcDOS</i> .....	48
5.1.2 Exprese proteinu <i>EcDOS</i> -PAS .....	49
5.2 Izolace proteinů <i>EcDOS</i> a <i>EcDOS</i> -PAS z buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3) .....	51
5.2.1 Izolace proteinu <i>EcDOS</i> z buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3).....	51
5.2.2 Izolace proteinu <i>EcDOS</i> -PAS z buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3).....	53
5.3 Charakterizace proteinů <i>EcDOS</i> a <i>EcDOS</i> -PAS .....	56
5.3.1 Charakterizace proteinu <i>EcDOS</i> .....	56
5.3.2 Charakterizace proteinu <i>EcDOS</i> -PAS .....	58
6 Diskuse .....	60
7 Závěr.....	66
Seznam použitých zdrojů.....	67

## Seznam použitých zkratk a symbolů

$A_{280}$	absorbance určená při vlnové délce 280 nm
AMP	adenosin-5'-monofosfát
AfGcHK	histidinkinasa z bakterie <i>Anaeromyxobacter</i> sp., kmen Fw 109-5, která detekuje kyslík a obsahuje senzorovou doménu s globinovou strukturou
AxPDEA1	fosfodiesterasa z bakterie <i>Acetobacter xylinum</i> , která detekuje kyslík a obsahuje senzorovou doménu s PAS strukturou
BIS	N,N'-methylen-bis-akrylamid
bp	páry bazí
$c$	molární koncentrace [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
c-di-GMP	cyklický bis-(3',5')-guanosinmonofosfát
CP motiv	strukturní motiv proteinů, které detekují hem, tvořený cysteinem předcházejícím prolinu v sekvenci aminokyselin
eIF2 $\alpha$	eukaryotický translační iniciační faktor 2 $\alpha$
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dosCP	operon, který obsahuje geny pro diguanylátcyklasu YddV a fosfodiesterasu EcDOS, v bakterii <i>Escherichia coli</i>
DosR	transkripční faktor, který reguluje expresi genů bakterie <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , efektor proteinu DosS nebo DosT
DosS	histidinkinasa s GAF strukturou senzorové domény, která detekuje kyslík a pochází z bakterie <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DosT	histidinkinasa, která detekuje kyslík a obsahuje GAF strukturu senzorové domény, vyskytující se v bakterii <i>Mycobacterium tuberculosis</i>



EAL	subdoména s fosfodiesterasovou aktivitou
<i>EcDOS</i>	přímý kyslíkový senzor s fosfodiesterasovou aktivitou pocházející z bakterie <i>Escherichia coli</i> , alternativně nazývaný <i>EcDosP</i>
<i>EcDOS-PAS</i>	izolovaná senzorová doména přímého kyslíkového senzoru s fosfodiesterasovou aktivitou pocházející z bakterie <i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	bakterie <i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FhlA	z angl. formate hydrogenlyase transcriptional factor; transkripční faktor, který se vyskytuje u bakterie <i>Escherichia coli</i>
FixL	kinasa, která detekuje kyslík a obsahuje senzorovou doménu s PAS strukturou, vyskytující se v bakterii <i>Rhizobium meliloti</i>
GAF	strukturní motiv proteinů, akronym odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých byl tento motiv objeven: cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterases, <i>Anabaena</i> adenyl cyclases a <i>Escherichia coli</i> formate hydrogenlyase transcriptional activator
GCS	z angl. globin-coupled oxygen sensor; protein, který detekuje kyslík a jeho senzorová doména má globinovou strukturu
GGDEF	subdoména s diguanylátcyklasovou aktivitou
GTP	guanosin-5'-trifosfát
Hap1	protein, který detekuje kyslík a zároveň reguluje expresi genů v kvasinkách
HRI	z angl. heme regulated inhibitor; inhibitor, který je regulovaný hemem nebo také kinasa eukaryotického iniciačního faktoru 2 $\alpha$ , která je regulovaná hemem
HemAT	aerotaktický transduktor, který obsahuje hem; kyslíkový senzor s globinovým uspořádáním senzorové domény

HemAT- <i>Bs</i>	HemAT, který pochází z bakterie <i>Bacillus subtilis</i>
HemAT- <i>Hs</i>	HemAT, který pochází z archebakterie <i>Halobacterium salinarum</i>
huHb	lidský hemoglobin
CheA	histidinkinasa, která je spolu s proteinem CheY součástí dvousložkového signalizačního systému bakterií
CheY	protein, který je spolu s histidinkinasou CheA součástí dvousložkového signalizačního systému bakterií
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
$k_{cat}$	katalytická konstanta, také označována jako číslo přeměny enzymu [ $\text{min}^{-1}$ ]
$k_{on}$	asociační konstanta [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$k_{off}$	disociační konstanta [ $\text{s}^{-1}$ ]
$l$	optická dráha paprsku světla [cm]
LB médium	Luria Broth médium
$M$	molekulová hmotnost [Da]
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
MWCO	z angl. molecular weight cut-off; nejvyšší molekulová hmotnost pronikajících látek
OD <sub>600</sub>	optická denzita měřená při 600 nm
PAS	strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů; akronym odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých byl tento motiv objeven: „ <i>Drosophila</i> period clock protein (PER)“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)“ a „ <i>Drosophila</i> single minded protein (SIM)“
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid

PpsR	z angl. „ <b>p</b> hotopigment suppressor <b>p</b> rotein <b>R</b> “; protein, který obsahuje doménu s PAS strukturou, pocházející z bakterie <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
RPM	z angl. revolutions per minute; počet otáček za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného
TB médium	Terrific Broth médium
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV/VIS	ultrafialovo-viditelná oblast elektromagnetického záření
v/v	objemová procenta
w/v	hmotnostně-objemová procenta
YddV	diguanylátcyklasa, která obsahuje senzorovou doménu s globinovou strukturou, vyskytující se v bakterii <i>Escherichia coli</i> , alternativně nazývaná <i>EcDosC</i>
$\varepsilon$	molární absorpční koeficient [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]

# 1 Úvod

Jedním z nejdůležitějších kofaktorů, který je nezbytný k zajištění správného fungování některých proteinů a enzymů, je hem [1]. Jedná se o nedílnou součást hemoproteinů, které plní v organismu včetně lidského mnoho nezbytných funkcí. Hemoproteiny zajišťují například transport a skladování kyslíku nebo obstarávají přenos elektronů v dýchacím řetězci. V současné době se kromě těchto známých funkcí hemoproteinů vyčleňuje nová skupina hemoproteinů. Tyto proteiny jsou schopny detekovat měnící se koncentraci hemu anebo v jejich případě funguje hem jako místo detekce plynných molekul. Jedná se o skupinu hemových sensorových proteinů, kterou lze dále rozdělit na sensorové proteiny detekující hem, a na sensorové proteiny, které detekují plyny. Sensorové hemoproteiny se podílí na regulaci řady fyziologických funkcí, například na regulaci transkripce a degradace proteinů v eukaryotických organismech či na regulaci virulence a tvorby biofilmů v prokaryotických organismech.

Vzhledem k významným funkcím, které sensorové hemoproteiny vykonávají v živých organismech, je jejich studium lákavou oblastí biochemie. Zatím však nebyl doposud plně objeven molekulární mechanismus jejich působení. Teoretická část této bakalářské práce se věnuje shrnutí dosavadních poznatků ohledně hemových sensorových proteinů.

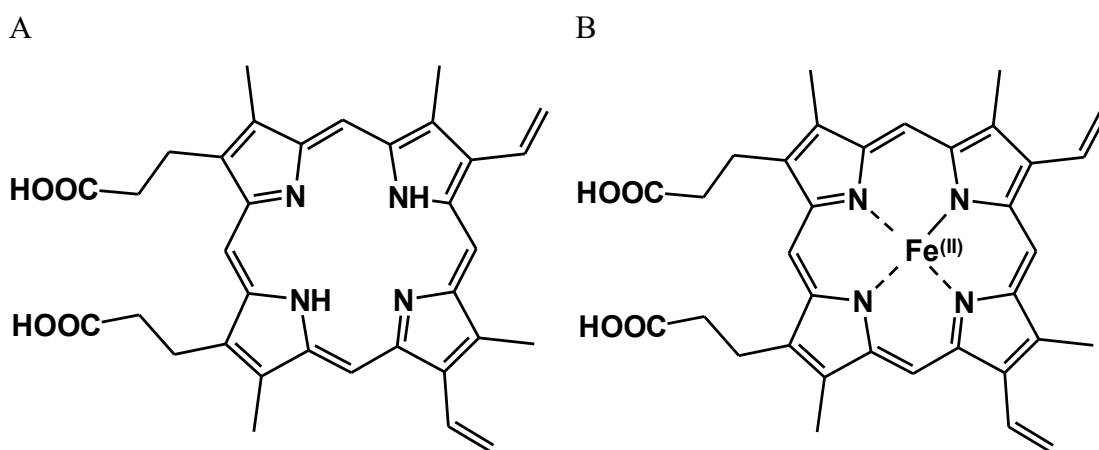
Hemové sensorové proteiny, které detekují plyny, jsou důležité v bakteriích. Tyto proteiny například napomáhají bakteriím detekovat množství kyslíku v okolním prostředí. Na základě této informace mohou pak bakterie přizpůsobit tomuto prostředí svůj metabolismus. Mezi bakteriální senzory patří hemoprotein *EcDOS* (z anglického názvu „*Escherichia coli* direct oxygen sensor“), který detekuje kyslík [1,2]. Tento protein byl zvolen spolu se svojí sensorovou doménou jako předmět experimentální části této práce. Úkolem této části byla příprava obou proteinů, jejich předběžná charakterizace a následná komparace jejich vlastností.

Podrobné prozkoumání mechanismu působení bakteriálních sensorů, pravděpodobně umožní vytvoření umělého signálu, na který sensorové proteiny bakterie zareagují ztrátou své funkce. Takový umělý signál by teoreticky mohl vést ke zničení celé bakterie, a na tomto principu by se posléze mohla vyvinout antibiotika nové generace.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Charakteristika hemoproteinů

Hemoproteiny náleží do skupiny metaloproteinů. Jedná se o složené bílkoviny, jejichž prostetickou skupinu představuje hem [3]. Hem se skládá ze čtyř pyrrolových kruhů. Tato pyrrolová jádra jsou propojena methinovými můstky v  $\alpha$ -polohách, a vytváří tak porfinový skelet. Výsledkem je planární struktura [4]. Z porfinu vznikají jeho deriváty, porfyriny, substitucí uhlíkových řetězců v  $\beta$ -polohách [5]. Jeden z patnácti možných izomerů, které mohou vzniknout substitucí, se nazývá protoporfyrin IX a jako jediný je přítomen v živých soustavách [4]. Zároveň se také vyskytuje v hemoproteinech [5]. Tento izomer obsahuje jako substituenty čtyři methylové, dva vinylové a dva propionátové postranní řetězce [4,5]. Protoporfyrin IX je slabou dvojsytnou kyselinou. V zásaditém prostředí vzniká sůl, přičemž dochází k záměně dvou pyrrolových atomů vodíku za iont kovu. V případě porfyrinových solí těžkých kovů se uplatňuje chelatační vliv volných elektronových párů dvou atomů dusíku v pyrrolovém jádru. Dochází tak ke koordinační stabilizaci centrálního iontu těžkého kovu. Porfyrinové komplexy iontu železa se vyznačují nejvyšší stabilitou [3]. Inkorporací železnatého kationtu do protoporfyrinu IX dochází ke vzniku ferroprotoporfyrinu IX. Tento komplex je také známý pod označením hem [5]. Struktury protoporfyrinu IX (A) a hemu (B) jsou vyobrazeny na obr. 2.1.

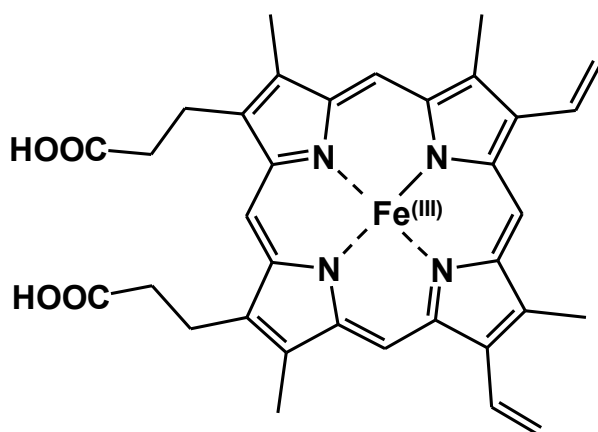


Obr. 2.1: Struktura protoporfyrinu IX (A) a hemu (B)

K nejstabilnějším komplexům železa náleží oktaedrické hexakomplexy. Z iontu železa, umístěného v centrální části komplexu, vychází šest koordinačně kovalentních vazeb k ligandům. Čtyři z těchto ligandů, dusíkové atomy porfyrinu, jsou ekvatoriální.

Dvě zbývající vazby mohou být využity k navázání jednoho nebo dvou ligandů. Tyto ligandy se pak označují jako axiální [3,5]. Může se jednat například o malé molekuly plynů (kyslík, oxid uhelnatý, oxid dusnatý, hydrogensulfidový aniont anebo kyanidový aniont) [5,6]. Příkladem dalších axiálních ligandů jsou postranní řetězce aminokyselin z proteinů, které interagují s hemem, přesněji pak zejména dusík imidazolového jádra histidinu nebo thiolátová skupina cysteinu. Tyto axiální ligandy se mohou napojit prostřednictvím volných elektronových párů, tedy především skrze skupiny obsahující kyslík, dusík nebo síru. Tímto způsobem pak vznikají hemoproteiny [3,7].

Kationt železa se může v komplexu protoporphyrinu IX vyskytovat v redukované nebo oxidované formě [3,5]. Termínem hem se označují obě formy komplexu – jak ta s železnatým kationtem [Fe(II)], tak ta s železitým kationtem [Fe(III)]. Oxidovanou formu kationtu železa, železitý kationt [Fe(III)], obsahuje komplex známý jako ferriprotoporphyrin IX, pro který se také běžně používá název hemin. Strukturní vzorec heminu je zobrazený na obr. 2.2.



**Obr. 2.2: Struktura heminu**

Hemoproteiny plní v organismu mnoho nezbytných funkcí. Jejich vysoká funkční variabilita umožňuje rozdělení hemoproteinů do čtyř hlavních skupin právě z hlediska jejich funkce.

1. Proteiny, které zajišťují transport a skladování plynných molekul (zejména kyslíku), představují první skupinu hemoproteinů. Jedná se například o hemoglobin a myoglobin. Hem obou těchto globulárních bílkovin se nachází mezi helixy E a F, nepolární části hemu jsou umístěny v nepolárním středu bílkoviny a polární propionátové skupiny naopak směřují k polárnímu povrchu bílkoviny. Jak již bylo zmíněno výše, iont železa, umístěný

v centrální části hemu, se váže čtyřmi vazbami na atomy dusíku protoporfyrinu IX a dvěma vazbami k axiálním ligandům. Jedním z ligandů je histidin F8 a druhým je molekula plynu. Nejdůležitějším zástupcem z těchto plyných molekul je pak kyslík, který je přenášen hemoglobinem a pro jeho skladování slouží myoglobin. Jiným příkladem plyné molekuly je oxid uhelnatý, jenž se může navázat na iont železa namísto kyslíku v molekule hemoglobinu, a může tak způsobit například otravu. Vazba kyslíku na hem v případě hemoglobinu je přibližně dvěstěkrát slabší než vazba oxidu uhelnatého na hem [3,8].

2. Cytochromy obstarávají přenos elektronů. Tuto činnost vykonávají například v dýchacím řetězci [8,9]. Cytochromy lze rozdělit do několika skupin na základě jejich absorpčního maxima v ultrafialovo-viditelné (UV/VIS) oblasti elektromagnetického záření. Tyto skupiny, které se označují jako a, b, c, d, f, o, se odlišují i strukturně [9]. Dále se pak ještě liší například v oxidačním stupni iontu železa v hemu. A právě změna oxidačního stavu tohoto iontu je podstatou biologické aktivity cytochromů. Jedná se o reverzibilní děj, při kterém se železnatý kationt oxiduje na železitý kationt, anebo se naopak železitý kationt redukuje na železnatý kationt, čímž následně dochází k přenosu elektronů [8,9].

3. V případě hemových enzymů, hem slouží jako kofaktor a umožňuje těmto enzymům katalyzovat převážně redoxní reakce. Příkladem těchto enzymů jsou peroxidasa a katalasa, které katalyzují reakce obdobným mechanismem. Enzymová reakce, již katalyzuje katalasa, je disproportionace peroxidu vodíku. Peroxidasa se pak účastní oxidace různých substrátů peroxidem vodíku [3,10]. K hemovým enzymům také náleží cytochromy P450, které se vyznačují širokou substrátovou specifikou. Uplatňují se například při oxidaci různých organických látek, syntéze steroidů či metabolismu xenobiotik [8–10].

4. Do čtvrté skupiny hemoproteinů patří hemové senzorové proteiny, které nevyužívají hem ani jako funkční, ani jako katalytické centrum, jak tomu bylo v případě tří předcházejících typů hemoproteinů [1]. Namísto toho jsou hemové senzorové proteiny schopny detekovat měnící se koncentraci hemu anebo v případě těchto hemoproteinů funguje hem jako místo detekce plyných molekul. Proto rozlišujeme ještě dvě podskupiny. Senzory, které detekují změnu koncentrace plynů, u nichž signalizace nastává po navázání molekuly plynu (signální molekula) na molekulu hemu. V případě senzorů, které detekují změnu koncentrace hemu, je signální molekulou sám hem. Oba

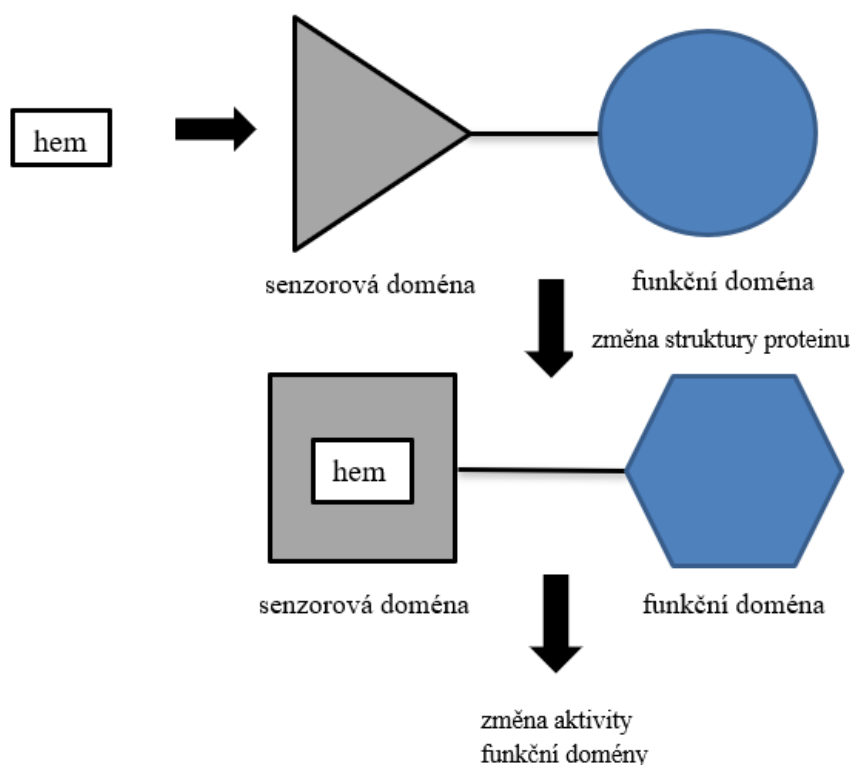
typy signalizace regulují řadu fyziologických procesů prokaryotických i eukaryotických organismů. Detailně se vlastnostmi a typickými zástupci této skupiny hemoproteinů zabývají následující dvě kapitoly (2.2, 2.3).

## **2.2 Senzorové proteiny, které detekují hem**

Kromě klasických zásadních biochemických rolí (vizte kapitola 2.1) se hem uplatňuje i při signalizaci [1,11]. Volný hem je však při množství větším než  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  cytotoxický [12]. Volný komplex hemu obsahující iont železa i samotný iont železa totiž katalyzuje Fentonovu reakci, při které vznikají hydroxylové radikály. Tyto radikály náleží k reaktivním formám kyslíku [11]. Aby se zabránilo vzniku reaktivních forem kyslíku, je potřeba udržovat koncentraci volného hemu v buňkách na poměrně konstantní (a nízké) hladině. Z tohoto důvodu dochází k regulaci jak syntézy hemu, tak jeho degradace [11,12]. Správně fungující senzorové proteiny udržují úzký rozsah koncentrace volného hemu a to tím, že když je hemu málo, podporují jeho syntézu, a v případě, kdy je hemu hodně, podporují expresi enzymů, které hem degradují [11]. Asociací hemu na tyto proteiny anebo naopak jeho disociací z těchto proteinů dochází k regulaci řady důležitých fyziologických procesů. Jedná se například o degradaci proteinů, regulaci kinasové aktivity, vazbu na deoxyribonukleovou kyselinu (DNA), transkripci, translaci a mnoho dalších [1].

Mechanismus regulace těchto procesů spočívá zejména ve skutečnosti, že hem zde funguje jako první signální molekula při intramolekulárním přenosu signálu. Proteiny, které detekují hem, obsahují minimálně dvě domény – doménu senzorovou a doménu funkční [1,13]. Senzorová doména slouží jako vazebné místo pro hem. Navázání hemu na senzorovou doménu vede ke strukturní změně této domény. Strukturní změna senzorové domény slouží jako sekundární signál, který následně vyvolává strukturní změnu funkční domény. Nakonec dochází ke změně aktivity funkční domény, a tím posléze i ke spuštění regulačního mechanismu příslušného procesu [13]. V řadě senzorových proteinů, které detekují hem, je funkční doména enzymem nebo transkripčním faktorem. Regulačního mechanismu se tedy funkční doména může přímo účastnit a je také schopna vykonávat finální činnost potřebnou pro regulaci daného procesu [1,13]. Mechanismus regulace senzorových proteinů detekujících hem je vyobrazený na obr. 2.3 (str. 17).





**Obr. 2.3: Mechanismus regulace sensorových proteinů, které detekují hem**

Na sensorovou doménu se naváže molekula hemu, což způsobí strukturní změnu této domény. Následně dojde i ke změně struktury funkční domény jako odpovědi na strukturní změnu sensorové domény. Výsledkem celého procesu je spuštění regulačních mechanismů, kterých se funkční doména účastní.

### 2.2.1 Specifické znaky sensorových proteinů, které detekují hem

1. Sensorové proteiny, které detekují hem, často obsahují thiolátovou skupinu cysteinu jako vazebné místo pro hem.

Molekula hemu se váže prostřednictvím svého centrálního iontu železa na sensorovou doménu sensorových proteinů, které hem detekují. Ve většině případů je tato reverzibilní vazba zprostředkována thiolátovou skupinou cysteinu nacházející se ve vazebném místě pro hem. Thiolát cysteinu tak slouží iontu železa hemu jako vhodný axiální ligand [13]. Iont železa hemu může z této skupiny snadno disociovat, protože vazba železitého kationtu hemu na thiolátovou skupinu cysteinu je relativně slabá. A právě toho využívají sensorové proteiny detekující hem, které jsou tak schopny zaznamenat aktuální koncentraci hemu v buňce a adekvátně na tuto skutečnost reagovat [1].

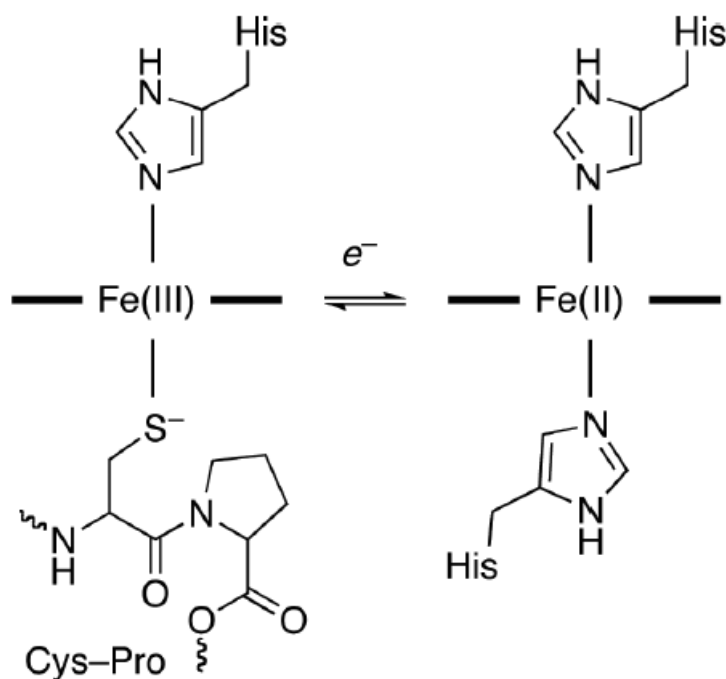
2. Často je v sousedství thiolátové skupiny cysteinu lokalizován prolin (tzv. CP motiv).

Většina sensorových proteinů, které detekují hem, obsahuje ve své sensorové doméně charakteristické uspořádání aminokyselin. Jedná se o tzv. „hem regulační motiv“. Tento strukturní motiv, příznačně také nazývaný CP motiv, je tvořen cysteinem předcházejícím prolinu v sekvenci aminokyselin. V polypeptidovém řetězci sensorové domény se tak aminokyseliny cystein a prolin nachází vedle sebe [1,14]. Thiolátová skupina cysteinu, jak již bylo zmíněno výše, slouží hemu jako axiální ligand [13]. A právě modulaci této koordinace cysteinu na kationt železa v hemu usnadňuje sousední zbytek prolinu [15]. Ten destabilizuje interakci thiolátového zbytku cysteinu, čímž dochází k oslabení síly dané interakce a k jednodušší disociaci hemu ze sensorové domény. „Hem regulační motiv“ zprostředkovává interakci mezi hemem a proteinem, a je tak užitečný i při detekci hemu [13].

Počet CP motivů se liší v případě různých sensorových proteinů, které detekují hem. Například protein s názvem inhibitor, který je regulovaný hemem (HRI), obsahuje dva CP motivy v C-terminální doméně. Mutací Pro410, jenž se nachází vedle Cys409, HRI ztrácí schopnost detekovat hem [1]. V sensorové doméně proteinu, který detekuje kyslík a reguluje expresi genů v kvasinkách, známého pod zkratkou Hap1, se vyskytuje dokonce sedm CP motivů [14]. Ani přítomnost CP motivu není jednoznačným důkazem toho, že daný protein patří do skupiny sensorových proteinů, které detekují hem. Je to z toho důvodu, že některé proteiny z této skupiny nemají CP motiv vůbec, i přesto však dokáží hem detekovat. A naopak jen určité CP motivy v sensorové doméně této skupiny proteinů se využívají jako vazebná místa pro hem [1].

3. V některých případech dochází k výměně ligandů hemu v závislosti na oxidačním stavu jeho iontu železa.

Zajímavým rysem sensorových proteinů, které detekují hem, je schopnost redukce železitého kationtu v hemu na kationt železnatý, která může nastat při redoxním stresu v buňce [1]. Důsledkem této reakce je substituce cysteinového zbytku, což je jeden z axiálních ligandů heminu. Tento ligand je nejčastěji nahrazen imidazolovou skupinou aminokyseliny histidinu [13]. Obecně se jedná o ligandy obsahující dusík [1]. Negativně nabitá thiolátová skupina cysteinového zbytku by totiž odpuzovala železnatý kationt hemu, který je slaběji nabitý než železitý kationt v heminu. Celý proces je vyobrazený na obr. 2.4 (str. 19).



**Obr. 2.4: Záměna ligandů hemu vlivem změny oxidačního stavu iontu železa v hemu; převzato z [13]**

Axiálním ligandem heminu je cysteinový zbytek, který je součástí CP motivu. Po redukci železitého kationtu v hemu na kationt železnatý dochází k záměně cysteinu za ligand obsahující dusík. V tomto případě se jedná o imidazolovou skupinu histidinu.

Záměna ligandů hemu je důležitá pro funkci sensorových proteinů, které detekují hem [13]. V závislosti na oxidačním čísle kationtu železa v hemu dochází k výměně ligandů, což následně vede ke strukturním změnám sensorové domény. Tato změna je pak signálem, který je přenesen do funkční domény. Výsledkem jsou funkční rozdíly, které mohou ovlivňovat některé mechanismy v organismu a prostřednictvím těchto mechanismů reagovat na redoxní podmínky způsobené oxidativním stresem.

#### 4. Rychlá disociace hemu.

Aby byla zajištěna rychlá a snadná disociace hemu z proteinu (v případě, že koncentrace hemu v buňce poklesne), tak je vazba mezi kationtem železa hemu a cysteinem sensorové domény proteinu relativně slabá. To je podstatné pro správnou funkci hemových sensorových proteinů, které tímto způsobem regulují mnoho fyziologických funkcí [1]. V tab. 2.1 (str. 20) jsou zaznamenány hodnoty asociačních a disociačních konstant pro HRI a lidský hemoglobin (huHb). Do skupiny hemových sensorových proteinů se řadí HRI. Jako zástupce klasických hemoproteinů byl vybrán huHb. Hodnoty jsou převzaty z publikací [16–18]. Z daných hodnot v tab. 2.1 je patrné, že hodnoty rychlostních konstant asociace ( $k_{on}$ ) jsou v obou případech řádově shodné. Obě skupiny hemoproteinů,

tedy senzorová i nesenzorová skupina, totiž asociují s hemem až při vyšší koncentraci hemu v buňce. Naproti tomu hodnoty rychlostních konstant disociace ( $k_{off}$ ) se v případě obou skupin hemoproteinů řádově liší. U senzorových proteinů jsou tyto hodnoty o tři řády vyšší než v případě nesenzorových hemoproteinů. Je to z toho důvodu, že afinita obou těchto skupin k hemu je odlišná. Senzorové proteiny, které detekují hem, totiž musí být schopny hem rychle disociovat, což se projevuje právě v hodnotách jejich disociačních konstant. Tato skutečnost souvisí i s jejich nižší afinitou k hemu v porovnání s klasickými hemoproteiny [1]. Vzhledem k této vlastnosti mohou efektivně reagovat na změny koncentrace hemu.

**Tab. 2.1: Hodnoty asociačních a disociačních konstant vybraných hemoproteinů**

Hodnoty asociačních konstant ( $k_{on}$ ) pro hemem regulovaný inhibitor (HRI) a lidský hemoglobin (huHb) jsou srovnatelné. Hodnoty disociačních konstant ( $k_{off}$ ) se řádově liší v případě skupiny senzorových proteinů detekujících hem (HRI) a nesenzorových hemoproteinů (huHb).

Hemoprotein	$k_{on} [l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	literární zdroj
HRI	$1,1 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	[16]
huHb	$2,9 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^{-6}$	[17,18]

## 5. Flexibilita struktury

Klasické hemoproteiny mají poměrně rigidní strukturu, zatímco senzorové proteiny, které detekují hem, mají strukturu flexibilní [13,19]. Příklad, kterým lze danou flexibilitu velmi dobře ilustrovat, reprezentuje HRI. Tento senzorový protein obsahuje aminokyselinové axiální ligandy iontu železa hemu ve dvou různých doménách – v N-terminální (senzorové) doméně histidin a C-terminální (funkční) doméně cystein [1,19]. V nepřítomnosti hemu spolu obě domény neinteragují. Navázáním hemu na HRI dochází k velkým strukturním změnám proteinu, což následně vede k vzájemné interakci mezi doménami. Struktura HRI je tedy velmi flexibilní [1].

Důkazem flexibility senzorových proteinů, které detekují hem, může být také snaha (často neefektivní) o mutace axiálních ligandů hemu [1]. Jediná mutace axiálního ligandu velmi často nevyvolává změnu vlastností (včetně změny absorpčního spektra daného proteinu). Až po dvou nebo třech mutacích aminokyselin, které mohou v interakci s iontem železa hemu alternovat, se teprve projeví daný efekt. Hemové senzorové proteiny tak ztratí schopnost vázat hem, a tudíž plnit svoji funkci. Pokud neeliminujeme všechny aminokyseliny schopné alternovat v interakci s iontem železa hemu, flexibilita

proteinu vyústí ve snadnou záměnu ligandu za postranní řetězec sousední aminokyseliny [1,19,20].

### **2.2.2 Zástupce senzorových proteinů, které detekují hem – hemem regulovaný inhibitor**

Mezi zástupce senzorových proteinů, které detekují hem, patří HRI. Jedná se o enzym, jenž se také nazývá kinasa eukaryotického iniciačního faktoru  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), která je regulovaná hemem [21]. Patří do větší rodiny eIF2 $\alpha$  kinas, což jsou senzory, které jsou aktivovány za různých stresových podmínek [22]. HRI se uplatňuje mimo jiné při diferenciaci a zrání erytrocytů. Při těchto procesech je důležité, aby všechny tři složky hemoglobinu, tedy  $\alpha$ -globin,  $\beta$ -globin a hem, vznikaly v poměru 2 : 2 : 4. Při tomto poměru totiž dochází k vytvoření stabilní struktury  $\alpha_2\beta_2$ -hemoglobinu. V případě nedodržení tohoto poměru (tedy nadbytku nebo naopak nedostatku jedné ze složek) nastává nebezpečná situace, kdy všechny tři složky jsou cytotoxické pro maturované červené krvinky. V případě nedostatku hemu je nutné proteosyntézu globinů zastavit a k tomu právě slouží HRI [23].

HRI je součástí regulačního mechanismu translační fáze proteosyntézy, který se využívá právě v případech, kdy je v eukaryotických buňkách nedostatečné množství hemu [21,23]. Při nedostatku hemu nejprve dochází k aktivaci HRI několikanásobnou autofosforylací. Další autofosforylační reakcí dochází k vytvoření stabilní dimerní formy HRI. Vznik této formy je umožněn pouze v případě, kdy hem přítomen není. Následně dochází k fosforylaci  $\alpha$ -podjednotky eIF2 $\alpha$  na Ser51. Pokud však hem přítomen je, k fosforylaci eIF2 $\alpha$  nedochází. Eukaryotický iniciační faktor  $2\alpha$  je velice důležitým regulačním faktorem translace. Pokud je fosforylován dojde k zastavení proteosyntézy v její iniciační fázi [22,23].

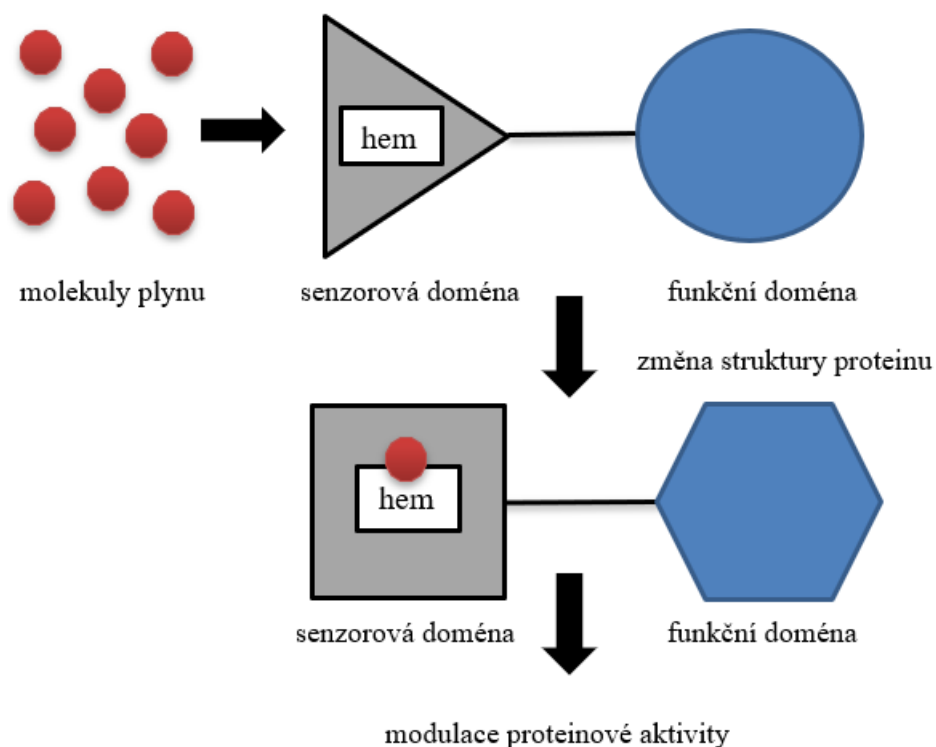
Translační regulace HRI je obzvláště důležitá při patologických stavech, které se vyznačují přítomností nedostatečného množství hemu anebo nadměrného množství globinů. HRI zajistí, aby se v takových případech produkovaly další řetězce globinů, a tím HRI zlepšuje stav osob postižených těmito nemocemi. Jedná se například o erythropoetickou protoporfyrrii,  $\beta$ -thalassemii a sideropenickou anemii [23].

## 2.3 Senzorové proteiny, které detekují plyny

Hemové senzorové proteiny, které detekují plyny, regulují v živých organismech značné množství patologických a fyziologických dějů. Jak již bylo zmíněno výše, jsou tyto proteiny schopny rozpoznat aktuální koncentraci molekul plynů ve svém okolí a následně dané procesy, které probíhají v organismech, regulovat [24]. Mezi nejčastější molekuly plynů, které jsou tyto proteiny schopny detekovat, patří molekuly kyslíku a molekuly dvou toxických plynů – oxidu uhelnatého a oxidu dusnatého [24,25]. Senzorové proteiny, které detekují plyny, byly objeveny u řady organismů, bakteriemi počínaje a savci konče [25]. Tyto proteiny jsou typické pro bakteriální organismy. Ze známých eukaryotických zástupců lze jmenovat například rozpustnou guanylátcyklasu. Jedná se o protein, který detekuje oxid dusnatý [24,26].

Senzorové proteiny, které detekují plyny, obsahují ve své struktuře (podobně jako senzorové proteiny, které detekují hem – vizte kapitola 2.2) minimálně dvě domény – doménu senzorovou a doménu funkční. V N-terminální části proteinů je běžně situována senzorová doména [1]. V některých senzorových proteinech, které detekují plyny, je tato doména umístěna v centrální oblasti mezi N-koncem a C-koncem proteinů [27]. Funkční doména se pak obvykle nachází v C-terminální části hemoproteinů. K senzorové doméně je pevně navázána molekula hemu. Kationt železa hemu v senzorové doméně slouží jako vazebné místo pro plynné molekuly [1]. Molekuly kyslíku a oxidu uhelnatého se asociují výhradně s hemem senzorové domény, který obsahuje železnatý kationt. Oxid dusnatý se váže na hem senzorové domény, který obsahuje buď železnatý, nebo železitý kationt [24].

Mechanismus regulace senzorových proteinů, které detekují plyny (vizte obr. 2.4, str. 23), je zahájen interakcí mezi molekulou plynu a kationtem železa hemu. Tato interakce poskytuje prvotní signál, který vyvolává strukturní změnu senzorové domény [24]. Tato změna může být považována za sekundární signál, který je přenesen do funkční domény. Následně dochází ke strukturním změnám této domény, které vyústí v modulaci proteinové aktivity [1,25]. Funkční doména slouží buď jako transkripční faktor [28], anebo vykazuje enzymovou aktivitu [1]. Jedná se nejčastěji o aktivitu histidinkinasovou [29], aktivitu diguanylátcyklasovou [30] anebo aktivitu fosfodiesterasovou [31].



**Obr. 2.4: Mechanismus regulace sensorových proteinů, které detekují plyny**

K molekule hemu, která je pevně vázána v sensorové doméně, se asociuje molekula plynu, což způsobí strukturní změnu této domény. Následně dojde i ke změně struktury funkční domény jako odpovědi na strukturní změnu sensorové domény. Výsledkem celého procesu je spuštění regulačních mechanismů, kterých se funkční doména účastní.

Hemové sensorové proteiny, které detekují plyny, lze dále rozdělit do tří podskupin podle druhu plynu, který detekují – tedy na proteiny, které detekují oxid dusnatý, na proteiny, které detekují oxid uhelnatý, a na proteiny, které detekují kyslík [24]. Se zřetelem ke skutečnosti, že experimentální část této bakalářské práce souvisí s proteinem, který detekuje kyslík, bude právě této skupině proteinů věnována pozornost v následující kapitole (2.3.1).

### 2.3.1 Sensorové proteiny, které detekují kyslík

Molekulární kyslík patří z fyziologického hlediska k nejdůležitějším plynům, které jsou nezbytné pro život aerobních organismů [1,32]. Nejlépe popsanou skupinou ze sensorových proteinů, které detekují plyny, jsou pak proteiny, které detekují právě kyslík. Tyto proteiny se vyznačují velkou diverzitou prostorových uspořádání svých sensorových a funkčních domén. V případě těchto proteinů dochází ke vzájemným kombinacím sensorových a funkčních domén, které se seskupují v různém počtu. Pro sensorové domény těchto proteinů jsou typická tři různá strukturní uspořádání. Podle

těchto uspořádání se proteiny, které detekují kyslík, dělí do tří skupin. O těchto skupinách pojednávají následující tři kapitoly (2.3.1.1, 2.3.1.2 a 2.3.1.3).

### 2.3.1.1 Kyslíkové senzory s GAF doménou

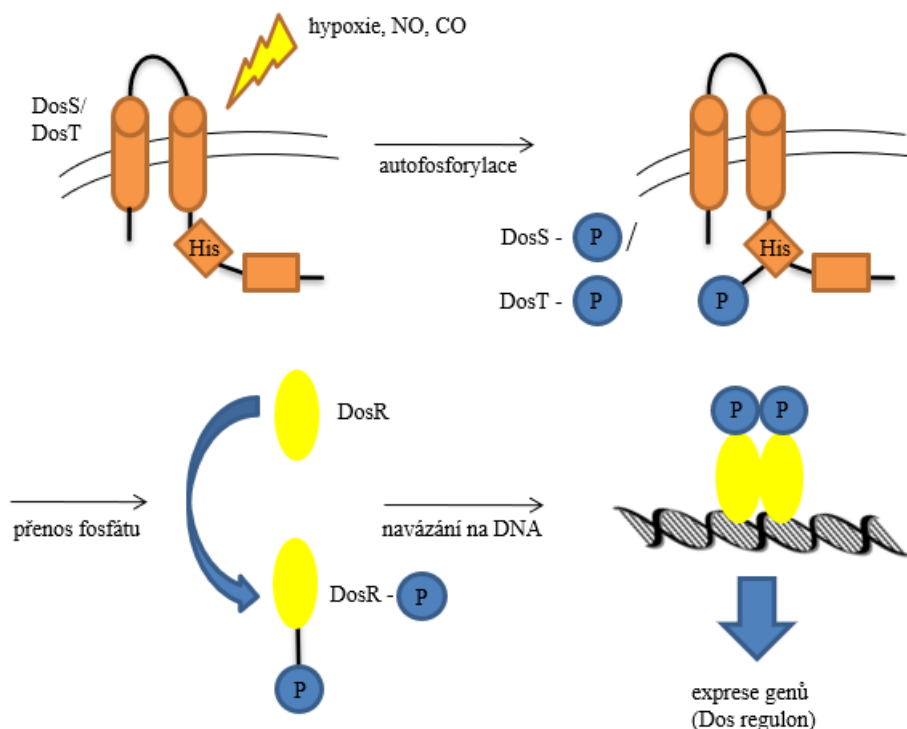
GAF doména byla poprvé identifikována u tří proteinů, kterými jsou cyklický guanosin-3',5'-monofosfát dependentní fosfodiesterasa, *Anabaena* adenylátcyklasa a transkripční faktor FhlA, jenž se vyskytuje v bakterii *Escherichia coli* (*E. coli*). Akronym GAF vznikl z jednotlivých začátečních písmen anglických názvů těchto proteinů [1,33]. Přítomnost GAF domén byla zaznamenána v mnoha signalizačních a senzorových proteinech, které se vyskytují v prokaryotických i eukaryotických organismech [34].

Struktura GAF domény sestává z centrálně umístěného  $\beta$ -skládaného listu, jenž je tvořen pěti antiparalelními řetězci. Tento  $\beta$ -list je obklopen čtyřmi  $\alpha$ -helixy, které spojují antiparalelní řetězce  $\beta$ -listu a vytváří kapsu pro navázání ligandu, resp. prostetické skupiny [24,35]. Jedná se například o flaviny, adenin, cyklický guanosin-3',5'-monofosfát, formiát, 2-oxoglutarát a hem [24,36].

Proteiny, ve kterých se GAF domény vyskytují, plní v organismech mnoho funkcí. Například v bakteriálních organismech regulují genovou expresi a účastní se fixace dusíku. V rostlinách tyto proteiny detekují ethylen a podílí se na signalizaci. GAF domény jsou také součástí rostlinných a cyanobakteriálních fytochromů, které plní nepostradatelnou funkci při detekci světla a následném přenosu signálu [36]. Na regulaci buněčné koncentrace druhých posílů cyklického adenosin-3',5'-monofosfátu (cAMP) a cyklického guanosin-3',5'-monofosfátu se podílí proteiny s fosfodiesterasovou aktivitou. Tyto proteiny obsahují C-terminální katalytickou doménu a dvě GAF domény, které jsou umístěné v N-terminální části proteinů. Tyto domény jsou označovány jako GAF-A doména (situovaná blíže k N-konci proteinu) a GAF-B doména (blíže C-konci proteinu). Jedna z GAF domén je schopna vázat cyklický nukleotid, a tím regulovat katalytickou aktivitu fosfodiesteras [33]. Kyslíkové senzory s GAF doménou obsahují jako prostetickou skupinu hem. Tyto proteiny se vyskytují například v bakteriálních organismech, ve kterých mohou vytvářet tzv. dvousložkový signální systém. Příkladem těchto senzorových proteinů jsou dvě histidinkinasy DosS a DosT, které jsou přítomny v bakterii *Mycobacterium tuberculosis*. Součástí tohoto systému je také regulátor odpovědi DosR [37].



Bakterie *Mycobacterium tuberculosis* je schopna setrvat v latentním stavu, ve kterém ji nelze klinicky detekovat, až několik desítek let. Mimo jiné v tomto stavu není citlivá k působení většiny antituberkulotik [38]. Přejít bakterie z virulentního do latentního stádia jejího života je pravděpodobně způsoben hypoxií (resp. přítomností oxidu dusnatého anebo oxidu uhelnatého) [37]. Dalšími faktory, které také zapříčiňují přechod bakterie do latentního stádia, jsou nedostatek nutrientů a zvýšená acidita okolního prostředí [38]. Samotný mechanismus tohoto děje je zachycen na obr. 2.5 (str. 26). Vlivem prvotního signálu, tj. poklesu koncentrace kyslíku (hypoxie), dochází nejprve k autofosforylaci jednoho z histidinů proteinu DosS nebo DosT. Fosfátová skupina je následně přenesena na aspartátový zbytek transkripčního faktoru DosR [24,38]. Po vazbě fosforylovaného proteinu DosR na DNA je spuštěna exprese přibližně padesáti genů (Dos regulon), které jsou zodpovědné za přechod bakterie do latentního stavu [38,39]. Obě histidinkinasy, DosS i DosT, obsahují dvě N-terminální GAF domény a dvě C-terminální funkční domény. GAF domény obou těchto proteinů jsou strukturně podobné a uspořádané tandemově. Hem je navázán na jednu z GAF domén a jeho kationt železa vytváří vazebné místo pro kyslík [24,37]. Je-li na železnatý kationt hemu navázaný kyslík, jedná se o inaktivní formu proteinů. Aktivními se proteiny stávají až po disociaci kyslíku, tj. nemají-li navázaný ligand, nebo pokud je k nim asociovaný oxid dusnatý nebo oxid uhelnatý [40].



**Obr. 2.5: Signalizační kaskáda DosS/DosT; vytvořeno dle předlohy [41] a upraveno**

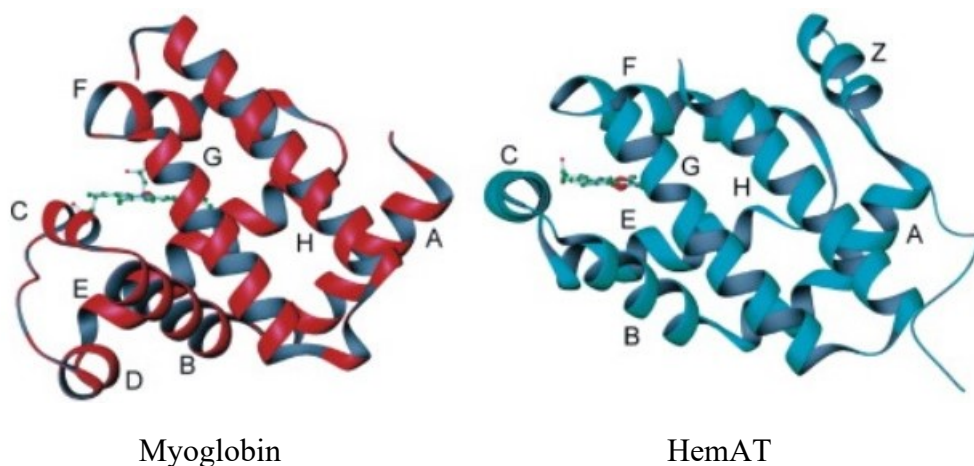
Histidinkinasa DosS nebo DosT detekuje hypoxické prostředí (eventuálně též oxid dusnatý anebo oxid uhelnatý). Následně dochází k autofosforylaci jednoho z histidinů DosS nebo DosT. Fosfátová skupina je přenesena na transkripční faktor DosR, který se naváže na DNA a spustí expresi genů (Dos regulon). Tyto geny umožňují přechod bakterie z virulentního do latentního stádia.

### 2.3.1.2 Kyslíkové senzory s globinovou doménou

Proteiny, které detekují kyslík a mají sensorovou doménu s globinovou strukturou, jsou běžně označovány zkratkou GCS. Tato zkratka pochází z jejich anglického názvu „globin-coupled oxygen sensor“ [24]. Tyto proteiny byly nalezeny v genomech řady organismů [42]. Jedná se o chimérické proteiny, které obsahují N-terminální sensorovou globinovou doménu a C-terminální funkční domény [32,42]. Tyto funkční domény mohou například regulovat expresi genů nebo také vykazovat enzymovou aktivitu. Jedná se například o kinasovou aktivitu, fosfodiesterasovou aktivitu, diguanylátcyklasovou aktivitu, adenylátcyklasovou aktivitu anebo methyltransferasovou aktivitu. Role některých funkčních domén zatím nebyla objevena [24,42].

Senzorová globinová doména se svojí strukturou značně odlišuje od struktury GAF (vizte kapitola 2.3.1.1) a PAS (vizte kapitola 2.3.1.3) domén [32]. Akronym PAS byl vytvořen z anglických názvů proteinů, ve kterých byl tento strukturní motiv poprvé

rozpoznán. Jedná se o následující tři proteiny: „*Drosophila* period clock protein“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „*Drosophila* single-minded protein“ [43]. Globinová doména se podobá strukturám myoglobinu a hemoglobinu, které jsou se senzorovými globinovými proteiny evolučně spřízněné [24,32,42]. Sekundární struktura globinové domény se skládá z osmi  $\alpha$ -helixů [42]. Tyto helixy jsou pospojovány krátkými segmenty. Jak je patrné z obr. 2.6, na rozdíl od myoglobinu, který se skládá z osmi  $\alpha$ -helixů označovaných A až H, globinová doména postrádá helix D a má zkrácený E-helix na C-konci [24,32,42]. Dalším evidentním rozdílem je přítomnost helixu Z v senzorové doméně. Helix Z je umístěn před helixem A. Na obr. 2.6 je jako příklad proteinu, který má senzorovou doménu s globinovým uspořádáním, uveden protein s názvem aerotaktický transduktor, který obsahuje hem (HemAT), u něhož je pořadí helixů senzorové domény následující: Z, A, B, C, E, F, G a H [44]. Proximálním ligandem kationtu železa hemu je histidin helixu F, který společně s helixy C, E a G vytváří kapsu pro navázání hemu [42]. Toto uspořádání se nazývá 3/3  $\alpha$ -helikální svinutí a vyznačují se jím dvě podskupiny globinových proteinů – globiny myoglobinového typu a senzorové globiny. Toto svinutí pravděpodobně napomáhá senzorovým globinům správně plnit jejich funkci. Třetí podskupinu globinových proteinů tvoří tzv. zkrácené globiny (z anglického názvu „truncated globins“). Pro uspořádání těchto proteinů je typické 2/2  $\alpha$ -helikální svinutí [32], které se vyznačuje chybějícím A-helixem. Helix F je z větší části ve tvaru neuspořádané smyčky [45].



**Obr. 2.6: Srovnání struktur myoglobinu a globinové domény proteinu HemAT; převzato z [44]**

Senzorová doména proteinu HemAT (aerotaktický transduktor, který obsahuje hem) z bakterie *Bacillus subtilis* a vorvaní myoglobin jsou si strukturně podobné. HemAT na rozdíl od myoglobinu postrádá D-helix, má zkrácený helix E a před A-helixem obsahuje navíc helix Z.

GCS proteiny vykazují několik specifických znaků. Oproti proteinům s GAF i PAS doménami, které jsou schopny vázat různé malé molekuly jako prostetické skupiny, váže globinová doména pouze hem [46]. Jejich další charakteristickou vlastností je skutečnost, že vazba signální molekuly kyslíku způsobí následné výrazné zvýšení katalytické aktivity jejich funkční domény. V případě většiny sensorových proteinů (s výjimkou *EcDOS*, vizte kapitola 2.3.1.3.1) s PAS a GAF doménami je tomu naopak. Vlivem disociace molekulárního kyslíku ze sensorové domény těchto proteinů dochází ke zvýšení katalytické aktivity funkční domény. V případě GCS proteinů je interakčním místem pro kyslík na distální straně hemu tyrosinový zbytek v poloze 10 helixu B, v případě většiny kyslíkových sensorů s PAS doménou je to však aminokyselina arginin [24].

Prvním popsaným zástupcem GCS proteinů byl v roce 2000 HemAT. Pro HemAT, který pochází z archebakterie *Halobacterium salinarum*, se zavedla zkratka HemAT-*Hs*. Zkratka HemAT-*Bs* pak značí, že daný HemAT pochází z bakterie *Bacillus subtilis* [47]. HemAT je složen z N-terminální sensorové domény s globinovou strukturou a rovněž z C-terminální funkční domény, která vykazuje vysokou homologii s cytoplazmatickými signálními doménami bakteriálních chemoreceptorů [1,24,32]. Předpokládá se, že vazba kyslíku na železnatý kationt hemu je stabilizována vodíkovými můstky, které vychází z hydroxylové skupiny aminokyseliny tyrosinu 70 v poloze 10 helixu B sensorové domény [32]. Funkční doména interaguje s histidinkinase CheA, která spolu s proteinem CheY vytváří dvousložkový signální systém bakterií [24]. Díky tomuto systému je HemAT schopen usměrňovat pohyb archebakterií a bakterií (například již zmíněné *Halobacterium salinarum* a *Bacillus subtilis*) na základě koncentračního gradientu molekulárního kyslíku [32]. Dalším zástupcem GCS proteinů je diguanylátcyklasa YddV, která je také nazývána *EcDosC*. Tento hemoprotein je pojmenován podle názvu sekvence DNA (gen *yddv*), která ho kóduje [24]. Mezi zástupce GCS proteinů patří také histidinkinasa *AfGcHK*, která byla izolována z mikroorganismu *Anaeromyxobacter* sp., kmen Fw 109-5 [48].

### **2.3.1.3 Kyslíkové senzory s PAS doménou**

Proteiny, které obsahují PAS doménu, jsou zastoupeny ve všech živých organismech (archea, bakterie i eukaryota). Tyto proteiny jsou součástí bakteriálního genomu [49], v případě eukaryotických organismů se pak vyskytují zejména jako transkripční faktory anebo napětově řízené kanály [43].

Trojrozměrná struktura PAS domény tvarově připomíná košík na ovoce. Tato struktura je složena z  $\beta$ -skládaného listu, který je tvořen pěti antiparalelními řetězci, a z několika  $\alpha$ -helixů. Tato skutečnost je pro PAS domény charakteristická [1,24]. PAS doména a GAF doména (vizte kapitola 2.3.1.1) vykazují podobnost ve své sekundární struktuře, což nasvědčuje jejich evoluční příbuznosti. Obě domény také obsahují kapsu pro navázání ligandu. Přestože si jsou obě domény strukturně podobné, v případě obou z nich se liší způsob navázání hemu a plynného ligandu [24,50]. V případě většiny zatím známých proteinů, které detekují kyslík, je jejich PAS doména umístěna v N-terminální části proteinu [1]. Přibližně jedna třetina PAS proteinů obsahuje dvě a více PAS domén, které spolu často sousedí [49]. V některých proteinech, které obsahují více PAS domén, se mohou vyskytovat i jiné domény, například GAF domény [51].

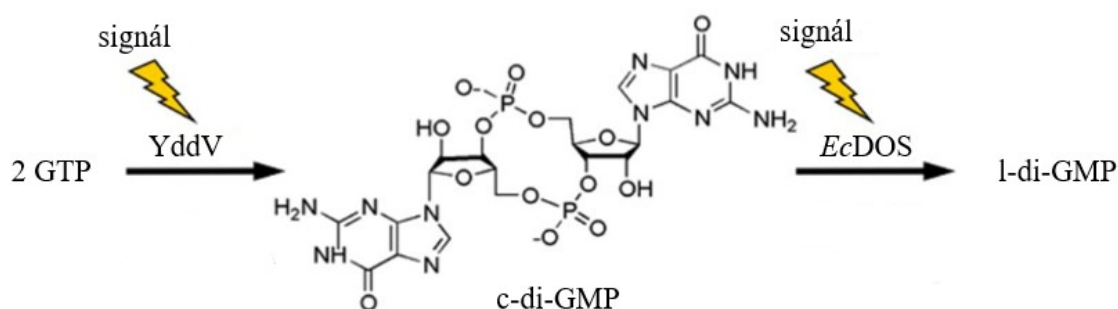
Proteiny, které obsahují PAS doménu, jsou umístěny v buněčném cytosolu. Detekcí různých fyzikálních i chemických signálů dokáží tyto proteiny monitorovat vnitřní i vnější prostředí buňky. Těmito signály jsou například změna redoxního potenciálu anebo elektromagnetické záření [43]. Některé PAS domény váží (kovalentně i nekovalentně) kofaktory, resp. prostetické skupiny. Těmito kofaktory jsou například flavinadenindinukleotid, flavinmononukleotid nebo kyselina 4-hydroxyskořicová [1]. Navázaný kofaktor může být přímo signálem, na který daný PAS senzor reaguje [51]. To (částečně) zajišťuje plasticitu PAS domény, která se projevuje právě při navazování různých ligandů [49]. Jiné PAS domény detekují signály prostřednictvím asociovaného kofaktoru. Tak je tomu i v případě hemových senzorových proteinů, které detekují kyslík. Signálem, který je zaznamenán pomocí hemu, je pak změna v koncentraci kyslíku [51].

PAS doména je spojena s velkou škálou funkčních domén enzymového i neenzymového charakteru [49]. PAS domény, které jsou spojené s funkčními doménami neenzymového charakteru, umožňují například interakci mezi proteiny [51]. K nejhojnějším funkčním doménám enzymového charakteru patří histidinkinasy, které jsou součástí dvousložkového signalizačního systému prokaryotických organismů [51]. Dalšími často se vyskytujícími funkčními doménami jsou serin/threoninkinasy, fosfodiesterasy a guanylátcyklasy [43,51]. PAS proteiny v lidských organismech představují například transkripční faktory, které reagují na hypoxické prostředí v buňce. Mezi PAS proteiny patří také některé z proteinů cirkadiálních rytmů [43]. Jedním z nejlépe charakterizovaných prokaryotních zástupců kyslíkových senzorů, které

obsahují PAS doménu, je fosfodiesterasa *EcDOS* bakterie *E. coli* [52]. Tento zástupce je podrobně popsán v následující kapitole (2.3.1.3.1).

#### 2.3.1.3.1 Fosfodiesterasa *EcDOS* (*EcDosP*)

Protein *EcDOS*, který je také označován zkratkou *EcDosP*, pomáhá udržovat homeostázu cyklického bis-(3',5')-guanosinmonofosfátu (c-di-GMP) v buňce [52]. Homeostáza c-di-GMP je nezbytná pro přežití bakteriálních organismů, ve kterých c-di-GMP funguje jako druhý posel [24]. V bakteriích c-di-GMP reguluje důležité fyziologické funkce, jakými jsou například dělení buněk, jejich pohyblivost, vývoj a vzájemná komunikace, anebo také virulence, tvorba biofilmu a fotosyntéza [53]. Koncentrace c-di-GMP v případě *E. coli* je regulována vzájemným působením *EcDOS* a YddV [24]. Biosyntézu c-di-GMP katalyzuje YddV, zatímco jeho degradaci katalyzuje *EcDOS* [1]. Degradace c-di-GMP spočívá v přeměně na jeho lineární formu l-di-GMP [24]. Na obr. 2.7 jsou znázorněny syntéza a štěpení c-di-GMP. Hodnota katalytické konstanty, která byla zjištěna pro YddV ( $k_{\text{cat}} > 0,022 \text{ min}^{-1}$ ), je o jeden řád nižší než hodnota katalytické konstanty, která byla zjištěna pro *EcDOS* ( $k_{\text{cat}} = 0,61 \text{ min}^{-1}$ ). Proto je limitujícím krokem při udržování homeostázy c-di-GMP v *E. coli* reakce, která je katalyzována YddV, jedná se o syntézu c-di-GMP [54]. Gen *yddv* a gen pro *EcDOS* jsou součástí operonu *dosCP*, který zajišťuje jejich vzájemnou expresi. Pravděpodobně se tvoří komplex YddV-*EcDOS* těchto dvou proteinů, které pracují synergicky na udržení homeostázy c-di-GMP v *E. coli* [55].

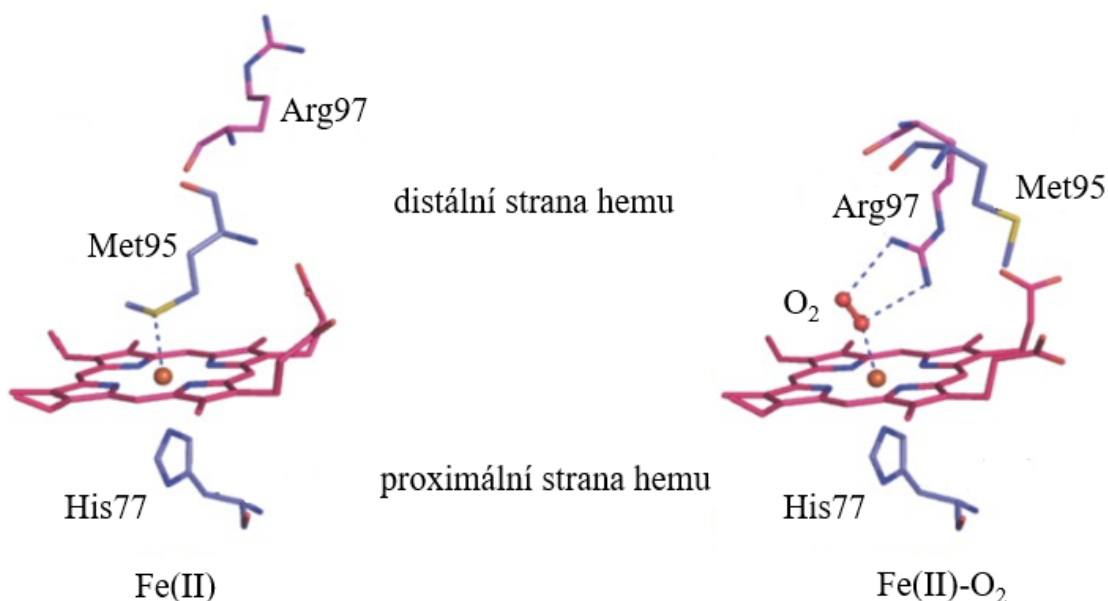


**Obr. 2.7: Syntéza a degradace cyklického bis-(3',5')-guanosinmonofosfátu (c-di-GMP) hemoproteiny YddV a *EcDOS*; převzato z [32] a upraveno**

Při reakci, kterou katalyzuje diguanylátcyklasa YddV, vzniká ze dvou molekul guanosin-5'-trifosfátu (GTP) jedna molekula c-di-GMP. Následně může dojít k přeměně c-di-GMP na lineární formu l-di-GMP. Tuto reakci katalyzuje fosfodiesterasa *EcDOS*.

Protein *EcDOS* je složen ze dvou tandemových PAS domén na N-konci a funkční fosfodiesterasové domény na C-konci. Hem je navázán pouze na jednu z PAS domén (PAS-A). Druhá PAS doména (bez hemu) je označována jako PAS-B. Axiálními ligandy železnatého kationtu hemu PAS-A domény jsou His77 na proximální straně a Met95 na distální straně. Železitý kationt hemu má na proximální straně jako ligand His77, na jeho distální straně je axiálním ligandem molekula vody nebo hydroxidový aniont [1,52,56,57]. Fosfodiesterasová doména obsahuje tzv. EAL subdoménu a tzv. GGDEF subdoménu. GGDEF subdoména je charakteristická pro diguanylátcyklasy. V případě *EcDOS* GGDEF subdoména pravděpodobně nevykazuje diguanylátcyklasovou aktivitu. EAL subdoména, která je příznačná pro fosfodiesterasy, katalyzuje hydrolytické štěpení c-di-GMP na l-di-GMP [24,58]. V případě, kdy je kationt železa hemu sensorové domény ve stavu Fe(III), je katalytická aktivita fosfodiesterasové domény minimální. Komplex hemu s železnatým kationtem je aktivní jen částečně. Aktivita se značně zvýší až navázáním kyslíku na železnatý kationt hemu sensorové domény. Obdobný efekt nastává i po navázání jiných ligandů hemu, například oxidu dusnatého, oxidu uhelnatého, kyanidového aniontu anebo imidazolu [24,59].

Molekulární mechanismus detekce signálu (molekuly kyslíku) fosfodiesterasou *EcDOS* byl popsán v mnoha studiích [24]. Po redukcí železitého kationtu hemu sensorové domény na kationt železnatý dochází k významným strukturním změnám celého hemoproteinu. Ovlivněna je také flexibilita proteinu. Po redukcí kationtu železa hemu dochází k záměně axiálního ligandu distální strany hemu, hydroxidového aniontu anebo molekuly vody, za Met95 [1,56,57]. Následné strukturní změny, které jsou spojeny s navázáním molekuly kyslíku na železnatý kationt hemu PAS-A domény, jsou vyobrazeny na obr. 2.8 (str. 32). Nejprve z distální strany hemu disociuje axiální ligand Met95, který je koordinovaný k železnatému kationtu hemu. Následně dochází k navázání molekuly kyslíku na kationt železa hemu [24,56,57]. Kyslík, který je asociován s železnatým kationtem hemu, přímo interaguje s Arg97 na distální straně hemu. Podobným způsobem probíhají i strukturní změny distální strany hemu po navázání oxidu dusnatého nebo oxidu uhelnatého [24,58]. Konformační změny na proximální straně hemu nejsou tak výrazné. Navázáním molekuly kyslíku na železnatý kationt hemu nedochází ke změně proximálního axiálního ligandu (His77). Nejdůležitějším strukturním rozdílem je otočení kruhu Tyr80 přibližně o 115°, které je způsobené navázáním molekuly kyslíku [52].



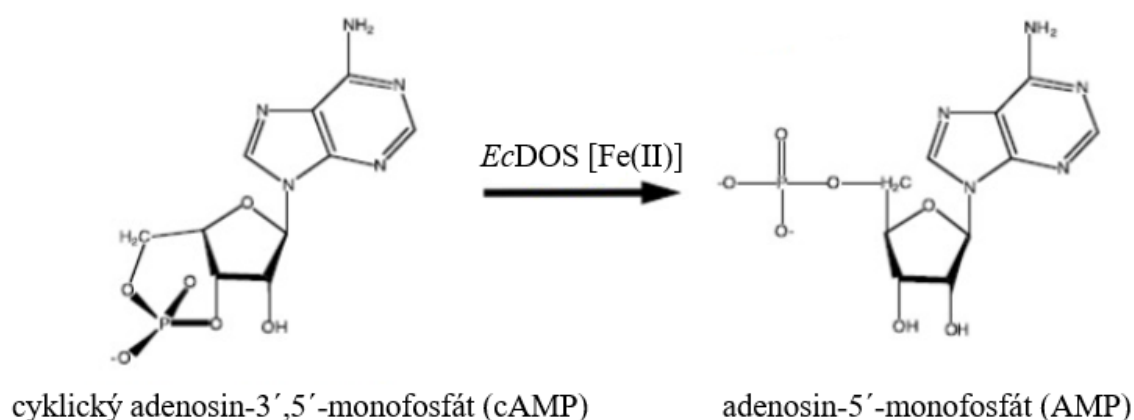
**Obr. 2.8: Struktura izolované PAS-A domény *EcDOS*; převzato z [52] a upraveno**

Navázáním molekuly kyslíku k iontu železa hemu dochází k rozsáhlým strukturním změnám v okolí hemu. Met95, axiální ligand distální strany hemu, disociuje a je nahrazen molekulou kyslíku, která přímo interaguje s Arg97. Postranní řetězec Arg97, který původně směřoval k povrchu proteinu, i postranní řetězec Met95, jenž původně mířil směrem k hemu, změnily svou polohu přibližně o 180°. Proximálním ligandem železnatého kationtu hemu je His77.

Aminokyselina Arg97 plní podstatnou úlohu při rozpoznání plyných molekul [24,58]. Mutací Arg97 dochází ke zvýšení rychlosti autooxidace a rychlosti disociace molekuly kyslíku ze železnatého kationtu hemu. Arg97 tak stabilizuje vazbu kyslíku k železnatému kationtu hemu, čímž snižuje rychlost autooxidace [60]. Konformační změny v okolí hemu pravděpodobně souvisí s katalytickou regulací *EcDOS* [61]. Disociací Met95 z železnatého kationtu hemu totiž dochází k posunu části proteinu na distální straně hemu směrem vzhůru nebo ke konformační změně proteinu. Následuje navázání molekuly kyslíku, oxidu dusnatého anebo oxidu uhelnatého. Výsledkem je zvýšení katalytické aktivity, kterého bylo dosaženo prostřednictvím intramolekulárního přenosu signálu [52]. Při mutaci axiálního ligandu Met95 v případě pentakoordinované formy komplexu hemu, tedy bez navázaného axiálního ligandu v šesté pozici, byla bazální katalytická aktivita fosfodiesterasové domény celkem vysoká. Po navázání molekuly O<sub>2</sub>, NO anebo CO na šestou pozici se katalytická aktivita fosfodiesterasové domény již významně nezvýšila. Z toho vyplývá, že Met95 potlačuje v případě *EcDOS* katalytickou aktivitu. K obnovení katalytické aktivity opět dojde asociací kyslíku k železnatému kationtu hemu senzorové domény [24,52,58].



Kromě c-di-GMP je alternativním substrátem pro *EcDOS* ještě cAMP. Produktem hydrolyzy cAMP, která je katalyzovaná *EcDOS*, je adenosin-5'-monofosfát (AMP). Tato reakce však probíhá mnohem nižší rychlostí než hydrolyza c-di-GMP [52]. Fosfodiesterasová katalytická aktivita pro cAMP v případě *EcDOS* byla zjištěna pouze pro komplex hemu s železnatým kationtem, nikoli pro komplex hemu s železitým kationtem. Oxidační stav kationtu železa hemu v *EcDOS* tedy ovlivňuje katalytickou aktivitu [57]. V případě *EcDOS* je hydrolyza cAMP inhibována navázáním oxidu uhelnatého nebo oxidu dusnatého na železnatý kationt hemu [52,62]. Hydrolyza cAMP je znázorněna na obr. 2.9.



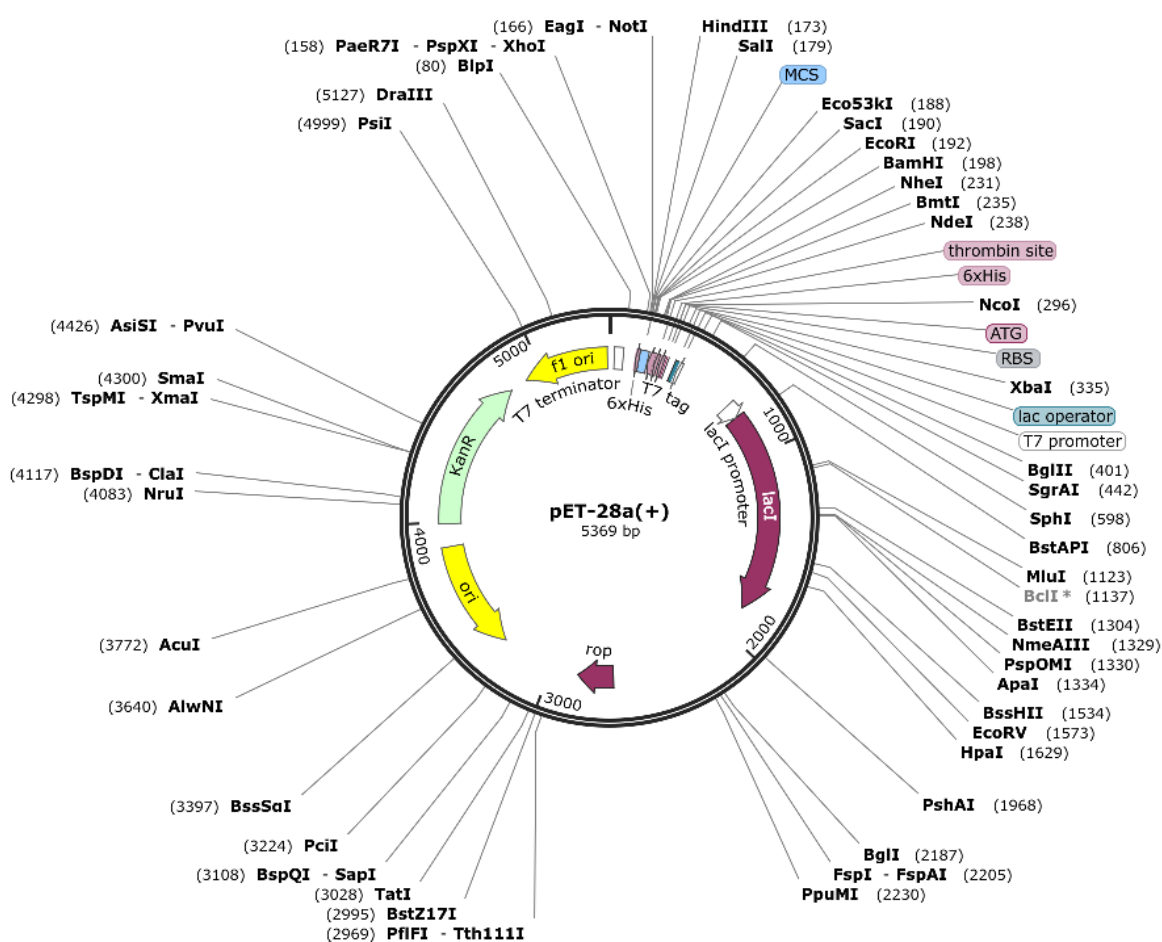
**Obr. 2.9: Degradace cAMP fosfodiesterasou *EcDOS*; převzato z [52] a upraveno**

Při reakci, kterou katalyzuje fosfodiesterasa *EcDOS*, dochází k přeměně cyklického adenosin-3',5'-monofosfátu (cAMP) na necyklický adenosin-5'-monofosfát (AMP). Tato reakce probíhá pouze v případě, kdy hem sensorové domény *EcDOS* obsahuje železnatý kationt.

## 2.4 Využití plasmidu pET-28a(+) pro expresi rekombinantních proteinů

K expresi proteinu *EcDOS*, resp. *EcDOS*-PAS byl využit plasmid pET-28a(+), který je složen z 5 369 párů bazí (bp). Mapa tohoto plasmidu je vyobrazena na obr. 2.10 (str. 34) [63]. Součástí plasmidu pET28a(+) je T7 promotor, T7 terminátor [64], gen pro histidinovou kotvu a gen, jenž zajišťuje rezistenci na antibiotikum kanamycin [63]. T7 promotor vykazuje specifitu zejména k T7 RNA polymerase, která je mnohem efektivnější než RNA polymerasa, jež je bakterii *E. coli* vlastní. Z tohoto důvodu geny, které jsou situované blízko za T7 promotorem, jsou exprimované ve zvýšené míře [65]. Jedním z těchto genů je v rámci této bakalářské práce právě gen, který kóduje protein *EcDOS*, resp. *EcDOS*-PAS.

Pro expresi proteinů *EcDOS* a *EcDOS-PAS* byly použity buňky BL-21 (DE3) bakterie *E. coli*, do nichž byl pomocí bakteriofága T7 vpraven gen pro T7 RNA polymerasu [65]. Tento gen je pod kontrolou *lac* operonu. Navázáním *lac* represoru (produkt genu *lacI*) na *lac* operon je regulován přístup ke genu pro T7 RNA polymerasu a je inhibována transkripce v bakterii *E. coli*. Přídavkem induktoru isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) je *lac* operon aktivován. Následně dochází k expresi T7 RNA polymerasy a záhy i k expresi genu pro požadovaný protein [63,66].



**Obr. 2.10: Mapa plasmidu pET-28a(+); převzato z [63]**

Plasmid pET-28a(+) je složen z 5 369 párů bází (bp). Na mapě tohoto plasmidu je pod označením KanR (světle zelená šipka) znázorněn gen zajišťující rezistenci ke kanamycinu. Fialový obdélník s označením 6xHis představuje histidinovou kotvu. Průhledný obdélník T7 promoter reprezentuje T7 promotor, na který usedá T7 RNA polymerasa, čímž je následně zahájena transkripce.

### 3 Cíle bakalářské práce

Pro předkládanou bakalářskou práci byly stanoveny následující cíle:

1. Prvním cílem této práce bylo vytvořit souhrn dosavadních publikovaných poznatků o hemoproteinech se zaměřením na hemové senzorové proteiny, které detekují plyny, konkrétně na protein *EcDOS*.
2. Druhým cílem byla transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) prostřednictvím plasmidu pET-28a(+)/*EcDOS* a exprese proteinu *EcDOS*.
3. Dalším úkolem bylo transformovat buňky *E. coli* BL-21 (DE3) plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS*-PAS a exprese proteinu *EcDOS*-PAS.
4. Následujícím cílem bylo izolovat z buněk *E. coli* BL-21 (DE3) protein *EcDOS*, purifikovat ho a pilotně charakterizovat.
5. Další úloha tkvěla v izolaci proteinu *EcDOS*-PAS z buněk *E. coli* BL-21 (DE3), v jeho purifikaci a pilotní charakterizaci.
6. Poslední cíl bakalářské práce spočíval v porovnání výtěžků přípravy obou proteinů a v následné komparaci jejich vlastností.

## 4 Přístroje, materiál a použité metody

### 4.1 Použité přístroje

Autokláv:	MLS-3781L, PHCbi
Bezdotykový kahan:	Gasprofi 2 SCS, WLD-TEC
Centrifugy:	Gilson, GmCLab Janetzki K70D, MLW Ultracentrifuga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter Z 383 K, Hermle Labortechnik
Centrifugační filtr:	Amicon Ultra, Merck Millipore
Elektroforetická aparatura:	Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad
Chromatografická kolona:	Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare
Chromatografický systém:	ÄKTAprime plus, GE Healthcare
Inkubátory:	Raven 2 Incubator, LTE Scientific Mini Heating Dry Bath Incubator, MD-MINI, Major Science
Laboratorní třepačky:	ES-60 Incubator Shaker, MIULab Multitron Standard, INFORS HT
Laboratorní váhy:	440-35N, KERN HM-200, A&D Instruments LTD MXX-601, Denver Instrument
Laminární box:	BIO 126, Labox
Magnetická míchačky:	C-MAG MS 7, IKA ESP Ultraflat Magnetic Stirrer, VELP Scientifica VARIOMAG Electronicrührer MONO, H + P Labortechnik
Mikrovlnný autokláv:	Microjet, Enbio Technology
Odsolovací kolonka:	PD midiTrap™ G-25, GE Healthcare
Rotační třepačka:	Chemos Group
Skener:	Perfection V550 Photo, Epson
Spektrofotometry:	Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies DS-11 Spectrophotometer, DeNovix
Termostat:	LS1, VLM Labortechnik
Ultrazvukový homogenizátor:	Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin

Zdroj pro elektroforézu: EPS 301, Electrophoresis Power Supply,  
Amersham Pharmacia Biotech

## 4.2 Použitý materiál a chemikálie

Bio-Rad, USA:	Precision Plus Protein™ Unstained Standard
Expedeon, Velká Británie:	InstantBlue™ Protein Gel Stain
Fluka, Švýcarsko:	Akrylamid, dodecylsírán sodný (SDS), N,N'-metylen-bis-akrylamid (BIS), lysozym, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 2-merkaptoethanol
GE Healthcare, USA:	TALON® Superflow™
LACHEMA BRNO, ČR:	Peroxodisírán amonný, ethanol, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), imidazol, bromfenolová modř
Lach-Ner, ČR:	Glycerol, kyselina chlorovodíková, dihydrogenfosforečnan draselný, dimethylsulfoxid, hydrogenfosforečnan draselný, chlorid sodný
Linde, ČR:	Dusík
OXOID LTD, Velká Británie:	Bacto Tryptone, Bacto Yeast Extract
Penta, ČR:	Glycin, hydrogenfosforečnan didraselný, dithioničitan sodný
SERVA Electrophoresis, Německo:	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
SIGMA, USA:	IPTG, Luria Agar, Luria Broth (LB), kanamycin, hemin
Stratagen, USA:	Bakteriální kmen <i>E. coli</i> BL-21 (DE3)

Plasmidy pET-28a(+)/*Ec*DOS a pET-28a(+)/*Ec*DOS-PAS byly poskytnuty laboratoří profesora Toru Shimizu, Univerzita Tohoku, Sendai, Japonsko.

V rámci experimentální části této bakalářské práce byl izolován plnodélkový protein *Ec*DOS a také byla izolována jeho senzorová doména (PAS-A).

## **4.3 Použité metody**

### **4.3.1 Příprava médií a pracovních roztoků**

#### **4.3.1.1 Příprava roztoku kanamycinu**

Navážka 240 mg antibiotika kanamycinu byla rozpuštěna v 4 ml deionizované vody pro získání roztoku kanamycinu o zásobní koncentraci  $60 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Tento roztok byl filtrován pomocí injekční stříkačky přes membránový filtr o průměru  $0,22 \text{ } \mu\text{m}$  do sterilní zkumavky Eppendorf.

#### **4.3.1.2 Příprava LB média**

Ve 100 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 2,5 g Luria Broth reagencie. Vzniklý roztok (LB médium) byl kvantitativně převeden do zásobní lahve a sterilizován v mikrovlnném autoklávu (Microjet, Enbio Technology) po dobu 20 minut při teplotě  $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.3.1.3 Příprava TB média**

Pro přípravu Terrific Broth (TB) média bylo nejprve v 2,7 l deionizované vody rozpuštěno 36 g Bacto Yeast Extract a 72 g Bacto Tryptone. Vzniklý roztok byl po 450 ml převeden do šesti Erlenmayerových baněk. Po uzavření hrdel těchto baněk hliníkovou fólií byly roztoky v nich sterilizovány (MLS-3781L, PHCbi) při teplotě  $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 20 minut. V 255 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 37,62 g hydrogenfosforečnanu draselného a 6,96 g dihydrogenfosforečnanu draselného. Tato směs byla filtrována přes filtrační papír, poté k ní bylo za stálého míchání přidáno 24 ml 50% (v/v) glycerolu a byla doplněna deionizovanou vodou na výsledný objem 300 ml. Nakonec byla tato směs sterilizována (MLS-3781L, PHCbi) při teplotě  $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 20 minut. Po sterilizaci bylo k 450 ml roztoku Bacto Tryptone a Bacto Yeast Extract v Erlenmayerově baňce přidáno 50 ml sterilního roztoku, který obsahoval hydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan draselný a glycerol.

#### **4.3.2 Příprava agarových ploten**

Ve 200 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 8 g Luria Agar. Vzniklý roztok byl převeden do zásobní lahve a sterilizován horkou vodní parou po dobu 20 minut při teplotě

121 °C v mikrovlnném autoklávu (Microjet, Enbio Technology). Těsně před následným použitím byl agar opět rozpuštěn pomocí mikrovlnného autoklávu při stejné teplotě a po stejnou dobu. Následně bylo do dvou sterilních zkumavek Falcon převedeno 70 ml agaru. Poté byl agar ponechán vychladnout na teplotu přibližně 50 °C a bylo k němu přidáno 70 µl kanamycinu (příprava vizte kapitola 4.3.1.1) o výsledné koncentraci 60 µg·ml<sup>-1</sup> (10 µl kanamycinu na 10 ml agaru). Směs byla promíchána a převedena na sedm sterilních Petriho misek (vždy 10 ml směsi na jednu Petriho misku). Petriho misky byly ponechány v laminárním boxu (BIO 126, Labox) na vodorovném povrchu při laboratorní teplotě, do ukončení procesu tvorby gelu.

#### **4.3.3 Transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) plasmidem pET-28a(+)/*Ec*DOS nebo plasmidem pET-28a(+)/*Ec*DOS-PAS**

##### **4.3.3.1 Transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) plasmidem pET-28a(+)/*Ec*DOS nebo plasmidem pET-28a(+)/*Ec*DOS-PAS bez teplotního šoku**

Kompetentní buňky *E. coli* BL-21 (DE3), plasmidy pET-28a(+)/*Ec*DOS a pET-28a(+)/*Ec*DOS-PAS byly vyjmuty z mrazáku a ponechány v nádobě s ledem a vodou po dobu cca 30 minut. Následně byly tyto buňky i plasmidy přesunuty do laminárního boxu (BIO 126, Labox). Poté bylo přichystáno sedm sterilních mikrozkuvek Eppendorf. Do každé z těchto mikrozkuvek bylo pipetováno 25 µl suspenze buněk *E. coli* BL-21 (DE3). Do třech z nich bylo přidáno postupně 0,5 µl, 1 µl a 5 µl roztoku plasmidu pET-28a(+)/*Ec*DOS. Do dvou z nich bylo pipetováno 0,5 µl a 3 µl plasmidu pET-28a(+)/*Ec*DOS-PAS. Při každé výše popsané transformaci byla vždy jedna směs ponechána jako negativní kontrola. Dále byly mikrozkuvky Eppendorf ponechány po dobu 10 minut na ledu, který byl umístěn vně laminárního boxu. Poté byly mikrozkuvky opět přemístěny do laminárního boxu a do každé z nich bylo pipetováno 60 µl LB média (příprava vizte kapitola 4.3.1.2). Obsah mikrozkuvek byl promíchán, převeden na jednotlivé agarové plotny (vizte kapitola 4.3.2) s kanamycinem o koncentraci 60 µg·ml<sup>-1</sup> (příprava vizte kapitola 4.3.1.1) a rovnoměrně rozprostřen po celé ploše agaru. Poté, co se suspenze vsákla do agaru, byly plotny uzavřeny parafilmem, otočeny dnem vzhůru a inkubovány po dobu 17 hodin při teplotě 37 °C (Raven 2 Incubator, LTE Scientific).

#### **4.3.3.2 Transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS* nebo pET-28a(+)/*EcDOS*-PAS teplotním šokem**

Kompetentní buňky *E. coli* BL-21 (DE3), plasmidy pET-28a(+)/*EcDOS* a pET-28a(+)/*EcDOS*-PAS byly stejně jako v předchozím případě (transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS* nebo plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS*-PAS bez teplotního šoku, vizte kapitola 4.3.3.1) ponechány v nádobě s ledem a vodou po dobu cca 30 minut. Poté bylo v laminárním boxu (BIO 126, Labox) do čtyř sterilních mikrozkušavek Eppendorf napipetováno 25  $\mu$ l suspenze buněk *E. coli* BL-21 (DE3). Do jedné z těchto mikrozkušavek bylo přidáno 0,5  $\mu$ l roztoku plasmidu pET-28a(+)/*EcDOS*. Do druhé mikrozkušavky byl pipetován 1  $\mu$ l plasmidu pET-28a(+)/*EcDOS*-PAS. Při každé transformaci buněk *E. coli* BL-21 (DE3) byl vždy ponechán jeden alikvot buněk bez přídavku plasmidu jako negativní kontrola. Všechny mikrozkušavky byly umístěny po dobu přibližně 30 minut na led, který se nacházel mimo laminární box. Následně byly buňky vystaveny teplotnímu šoku po dobu 45 sekund při teplotě 42 °C (LS1, VLM Labortechnik). Po vyjmutí z termostatu byly mikrozkušavky na časový úsek pěti minut opět přemístěny na led. Poté byly mikrozkušavky přesunuty do laminárního boxu a do každé z nich bylo pipetováno 250  $\mu$ l LB média (příprava vizte kapitola 4.3.1.2). Buňky byly následně inkubovány 60 minut při teplotě 37 °C (ES-60 Incubator Shaker, MIULab). Obsah mikrozkušavek byl promíchán, převeden na jednotlivé agarové plotny (vizte kapitola 4.3.2) s kanamycinem o koncentraci 60  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> (příprava vizte kapitola 4.3.1.1) a rovnoměrně rozprostřen po celé ploše agaru. Poté, co se suspenze vsákla do agaru, byly plotny uzavřeny parafilmem, otočeny opačně dnem vzhůru a inkubovány po dobu 17 hodin při teplotě 37 °C (Raven 2 Incubator, LTE Scientific).

#### **4.3.4 Exprese proteinu *EcDOS* nebo proteinu *EcDOS*-PAS v kompetentních buňkách *E. coli* BL-21 (DE3)**

V laminárním boxu (BIO 126, Labox) byly nachystány čtyři sterilní zkumavky Falcon. Do každé z nich bylo pipetováno 5 ml LB média a 5  $\mu$ l kanamycinu (60  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>). Následně byly na dvou agarových plotnách, které obsahovaly kolonie buněk *E. coli* BL-21 (DE3) transformované buď plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS*, nebo plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS*-PAS s využitím teplotního šoku (vizte kapitola 4.3.3.2), vybrány čtyři kolonie (vždy dvě kolonie z jedné plotny). Všechny kolonie byly pomocí sterilní pinzety a čtyř sterilních dřevěných tyčinek přemístěny do již zmíněných zkumavek Falcon.



Nakonec byly tyto jednobuněčné kolonie inkubovány v laboratorní třepačce (ES-60 Incubator Shaker, MIULab) při 200 RPM a teplotě 37 °C po dobu 18 hodin.

Do šesti Erlenmayerových baněk, které obsahovaly každá 500 ml TB média (příprava vizte kapitola 4.3.1.3), bylo pipetováno 0,5 ml kanamycinu o koncentraci 60  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Dvě baňky byly určeny pro expresi *EcDOS* a čtyři pro expresi *EcDOS-PAS*. Následovala inokulace, která byla provedena 0,5 ml suspenze příslušné jednobuněčné kolonie transformovaných buněk *E. coli* BL-21 (DE3). Výsledná směs byla inkubována v laboratorní třepačce (Multitron Standard, INFORS HT) při 170 RPM a teplotě 37 °C, dokud se hodnota optické denzity buněk *E. coli* měřená při 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) nevyskytovala v intervalu od 0,6 po 1,2 (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix). Po dosažení hodnoty z tohoto intervalu byly upraveny podmínky inkubace na 140 RPM a 15 °C po dobu 60 minut. Poté bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  směsi buněk připravených k indukci exprese proteinu *EcDOS* a 50  $\mu\text{l}$  směsi buněk připravených k indukci exprese proteinu *EcDOS-PAS* jako vzorků pro SDS elektroforézu (vizte kapitola 4.3.8). Následně byla indukována exprese proteinu *EcDOS* nebo proteinu *EcDOS-PAS* přidáním 0,1 ml IPTG o koncentraci 0,5  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  do všech šesti Erlenmayerových baněk. Obsah baněk byl inkubován v laboratorní třepačce (Multitron Standard, INFORS HT) při teplotě 15 °C a 140 RPM po dobu 18 hodin. Po skončení inkubace bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  směsi buněk exprimujících protein *EcDOS* nebo 50  $\mu\text{l}$  směsi buněk exprimujících protein *EcDOS-PAS* jako vzorků pro SDS elektroforézu (vizte kapitola 4.3.8). Exprese proteinu *EcDOS* nebo proteinu *EcDOS-PAS* byla ukončena centrifugací buněk *E. coli* (Janetzki K70D, MLW) při 3 000 RPM a 4 °C po dobu 45 minut. Buňky získané centrifugací byly přesunuty do zkumavky Falcon, zváženy (HM-200, A&D Instruments LTD) a následně uloženy při teplotě -80 °C pro následné použití.

#### **4.3.5 Izolace proteinu *EcDOS* nebo proteinu *EcDOS-PAS* z buněk *E. coli* BL-21 (DE3)**

Buňky, které obsahovaly exprimovaný protein *EcDOS*, a buňky s exprimovaným proteinem *EcDOS-PAS* (vizte kapitola 4.3.4), byly za laboratorní teploty rozmrazeny ve zkumavkách Falcon. Následně byly příslušné buňky resuspendovány v 50 ml resuspendačního pufru (50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl, pH = 8,0; 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA; 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  PMSF; 0,2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  lysozym). Vzniklá suspenze byla přesunuta do kádinky umístěné na ledu. Poté byla za stálého míchání (ESP Ultraflat Magnetic Stirrer,

VELP Scientifica) provedena ultrazvuková sonikace buněk (Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin). Tento proces probíhal při amplitudě 55 % v celkem 6 cyklech po dobu 1 minuty. Po každém sonikačním úseku následovala 45sekundová pauza. K oběma vzniklým homogenizátům byly přidány 3 ml roztoku heminu o výsledné koncentraci  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (koncentrace zásobního roztoku heminu  $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , rozpuštěn v dimethylsulfoxidu). Získané směsi byly za nepřetržitého míchání (VARIOMAG Electronicrührer MONO, H + P Labortechnik) inkubovány při teplotě  $4^\circ\text{C}$  po dobu 20 minut. Následně byly směsi centrifugovány (Ultracentrifuga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter, rotor 70 Ti) po dobu 70 minut při 55 000 RPM a teplotě  $4^\circ\text{C}$ . Získané supernatanty byly přesunuty do plastových nádobek a z každé z nich bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  jako vzorku pro SDS elektroforézu (vizte kapitola 4.3.8).

Izolace proteinu *EcDOS* i proteinu *EcDOS-PAS* pokračovala afinitní chromatografií. Jako afinitní nosič byl použit TALON Superflow (GE Healthcare, USA), který byl skladován v roztoku 20% (v/v) ethanolu. Pro izolaci každého z proteinů byly odebrány 3 ml suspenze TALONu a centrifugovány (Z 383 K, Hermle Labortechnik, rotor 220.86 V01) při teplotě  $4^\circ\text{C}$  a 200 RPM po dobu 2 minut. Po centrifugaci byl ethanol odstraněn a zbývající afinitní nosič byl ekvilibrován 5 ml pufru A ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl, pH = 8,0;  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl). Následná centrifugace proběhla při totožných podmínkách jako v předchozím případě a byla zopakována celkem třikrát. Po každé centrifugaci byl odstraněn pufr A. Získaná ekvilibrovaná suspenze TALONu (1,5 ml) byla inkubována za stálého míchání na rotační třepačce (Chemos Group) po dobu 1 hodiny při teplotě  $4^\circ\text{C}$  se supernatantem, který obsahoval protein *EcDOS*, popř. *EcDOS-PAS* (vizte předchozí odstavec). Poté byla tato směs přemístěna na chromatografickou kolonu s fritou a propláchnuta 50 ml pufru A. Následně byla kolona promyta 15 ml elučního pufru ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl, pH = 8,0;  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl;  $200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  imidazol). Eluovaný protein (*EcDOS* nebo *EcDOS-PAS*) byl zachycen do zkumavky Falcon, ze které byl odebrán vzorek na SDS elektroforézu (vizte kapitola 3.3.8).

K zakoncentrování vzorku proteinu *EcDOS* byl převeden eluát do zkumavky Falcon, která obsahovala centrifugační filtr Amicon Ultra od firmy Merck Millipore. Tento filtr obsahuje membránu schopnou zachytit proteiny o molekulové hmotnosti větší než 30 kDa (30 000 MWCO), tzv. „cut-off“ 30 kDa. K zakoncentrování vzorku proteinu *EcDOS-PAS* byl použit filtr s hranou propustnosti 10 000 MWCO. Obě směsi byly centrifugovány (Z 383 K, Hermle Labortechnik, rotor 220.86 V01) při teplotě  $4^\circ\text{C}$

a 4 000 RPM. Po každých 2 minutách byla centrifugace přerušena, aby mohl být příslušný roztok promíchán. Objem roztoku proteinu *EcDOS* byl snížen těsně pod 500  $\mu\text{l}$ . V případě roztoku proteinu *EcDOS-PAS* byl objem snížen přibližně na 750  $\mu\text{l}$ .

Dalším krokem izolace proteinů byla gelové chromatografie. Separace proteinů byla provedena na koloně Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) s využitím chromatografického systému (ÄKTAprime plus, GE Healthcare). Nejprve byla kolona ekvilibrována 30 ml mobilní fáze (20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl; 150  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; pH = 8,0). Vzorky po afinitní chromatografii byly před nanesením na kolonu přefiltrovány přes membránové filtry o průměru 0,22  $\mu\text{m}$ . Následně bylo aplikováno po 450  $\mu\text{l}$  těchto vzorků do dávkovače chromatografické aparatury. Pro vzorek *EcDOS-PAS* byla separace provedena dvakrát (při druhé separaci byl objem vzorku 300  $\mu\text{l}$ ). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,8  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a tlak na 1,1 MPa. Během gelové chromatografie byla měřena absorbance při vlnové délce 280 nm. Na základě kontinuálně měřených absorbancí byly jímány frakce s maximální absorbancí při 280 nm, které obsahovaly protein *EcDOS*, popřípadě frakce, které obsahovaly protein *EcDOS-PAS*. Odebrané frakce proteinu *EcDOS* byly spojeny. Stejně bylo postupováno i v případě *EcDOS-PAS*. Následně byly frakce centrifugací (Z 383 K, Hermle Labortechnik, rotor 220.86 V01) při teplotě 4 °C a 4 000 RPM (s promícháním automatickou pipetou po každých 2 minutách) zakoncentrovány na výsledný objem 250  $\mu\text{l}$  pro *EcDOS* a 700  $\mu\text{l}$  pro *EcDOS-PAS*. K tomuto účelu byly opět využity analogické centrifugační filtry Amicon Ultra jako při přípravě vzorků pro gelovou chromatografii (vizte odstavec výše). Poté bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  roztoku proteinu *EcDOS* a 50  $\mu\text{l}$  roztoku proteinu *EcDOS-PAS* jako vzorků pro SDS elektroforézu (vizte kapitola 4.3.8). Konečné preparáty *EcDOS* i *EcDOS-PAS* byly rozděleny po 40  $\mu\text{l}$  do zkumavek Eppendorf a zmrazeny kapalným dusíkem. Preparáty byly skladovány při teplotě -80 °C.

#### **4.3.6 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu *EcDOS* nebo proteinu *EcDOS-PAS* v roztoku**

Pro stanovení koncentrace proteinů byla využita metoda „A280“ na spektrofotometru DS-11 DeNovix. Tato metoda vychází z Lambert-Beerova zákona:

$$c = \frac{A_{280}}{\epsilon l} \quad (4.1)$$

kde  $A_{280}$  je absorpce určená při vlnové délce 280 nm,  $l$  značí optickou dráhu paprsku světla (jednotka cm),  $\varepsilon$  znamená molární absorpční koeficient buď proteinu *EcDOS*, nebo proteinu *EcDOS-PAS* (jednotka  $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) při vlnové délce 280 nm a  $c$  označuje molární koncentraci buď proteinu *EcDOS* nebo proteinu *EcDOS-PAS* v roztoku (jednotka  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Přístroj neuvedl koncentraci molární, ale koncentraci hmotnostní (jednotka  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), kterou přepočtl na základě zadané relativní molekulové hmotnosti proteinu *EcDOS* nebo *EcDOS-PAS*.

V databázi proteinů UniProt (<https://www.uniprot.org/>) byla vyhledána sekvence aminokyselin proteinů *EcDOS* a *EcDOS-PAS* [67], následně bylo využito programu ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>), pomocí kterého byla určena teoretická hodnota relativní molekulové hmotnosti (pro protein *EcDOS*  $M_r = 93\,004$ , pro protein *EcDOS-PAS*  $M_r = 15\,146$ ) a molárního absorpčního koeficientu (pro *EcDOS*  $\varepsilon = 95\,840\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , pro *EcDOS-PAS*  $\varepsilon = 16\,960\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Nejdelší optická dráha paprsku světla na spektrofotometru DS-11 DeNovix je 0,5 mm.

Jako „blank“ byly použity 2  $\mu\text{l}$  mobilní fáze z gelové chromatografie ( $150\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl;  $20\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl; pH = 8,0), které byly aplikovány na detekční plochu spektrofotometru. Následně byly změřeny absorpce při vlnové délce 280 nm pro totožné objemy roztoků proteinů, a tak stanoveny jejich koncentrace.

#### 4.3.7 Spektrofotometrická charakterizace proteinů *EcDOS* a *EcDOS-PAS*

Finální preparáty proteinů *EcDOS* a *EcDOS-PAS* byly charakterizovány s využitím spektrofotometru Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies. Bylo změřeno jejich absorpční spektrum mezi 200 až 700 nm. Preparát *EcDOS-PAS* byl zředěn na finální koncentraci  $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v roztoku  $20\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl;  $150\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; pH = 8,0 o celkovém objemu 1 ml. Preparát *EcDOS* byl zředěn na koncentraci  $2,5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ve stejném roztoku o celkovém objemu 0,6 ml. Bylo změřeno spektrum příslušných proteinů v nativním stavu, tj. ve stavu, ve kterém byly proteiny izolovány a kdy iont železa hemu byl ve své oxidované formě – Fe(III). Poté byl iont železa hemu v obou proteinech redukován dithioničitanem sodným a opět bylo změřeno jejich absorpční spektrum (iont železa hemu byl převeden do Fe(II) stavu). Následně byl po dobu přibližně 10 minut daný roztok proteinu probubláván CO (stav iontu železa hemu byl Fe(II)-CO). V případě *EcDOS-PAS* bylo navíc změřeno spektrum s iontem železa hemu ve stavu Fe(II)-O<sub>2</sub>. Roztok *EcDOS-PAS* byl vystaven vlivu dithioničitanu sodného, aby došlo k redukci iontu železa

hemu. Následně bylo redukční činidlo (které také reaguje a eliminuje kyslík z roztoku) odstraněno gelovou chromatografií na odsolovací kolonce (PD midiTrap<sup>TM</sup> G-25, GE Healthcare) promývacím pufrem (20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl; 150 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; pH = 8,0). Poté byl roztok *EcDOS*-PAS obsahující redukovaný iont železa inkubován na vzduchu po dobu přibližně pěti minut, aby s redukovaným iontem železa mohl reagovat vzdušný kyslík za vzniku formy Fe(II)-O<sub>2</sub>.

#### **4.3.8 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE byla provedena s využitím čtyř gelů. Pro přípravu elektroforézy bylo nejprve vybráno osm skel s příslušenstvím, které odpovídalo jednomilimetrové tloušťce gelu. Tato skla byla následně umyta, odmaštěna a umístěna proti sobě do stojanu na přípravu gelu. Pro analýzu vzorků odebraných během exprese a izolace proteinu *EcDOS* a exprese proteinu *EcDOS*-PAS byly použity 10% separační gely, které byly připraveny smícháním 10 ml pufru A (0,375 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl; 0,1% w/v SDS; pH = 8,8), 5 ml polymeračního roztoku A (30% w/v akrylamid; 0,8% w/v BIS pufru A), 15 µl TEMEDu a 150 µl peroxodisíranu amonného o koncentraci 100 mg·ml<sup>-1</sup>. Pro analýzu vzorků odebraných během izolace proteinu *EcDOS*-PAS byl použit 12% separační gel, který vznikl smísením 3 ml pufru A (0,375 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl; 0,1% w/v SDS; pH = 8,8), 2 ml polymeračního roztoku A (30% w/v akrylamid; 0,8% w/v BIS v pufru A), 5 µl TEMEDu a 50 µl peroxodisíranu amonného o koncentraci 100 mg·ml<sup>-1</sup>. Po smíchání všech uvedených komponent byly příslušné roztoky pipetovány mezi dvě již zmíněná skla a převrstveny deionizovanou vodou. Roztoky byly poté ponechány polymerovat přibližně 20 minut. Po vytvoření všech separačních gelů byla vrstva vody odstraněna. Dále byl pro přípravu čtyř 4% zaostřovacích gelů nachystán roztok, který vznikl smícháním 5,2 ml pufru B (0,125 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl; 0,1% w/v SDS; pH = 6,8), 800 µl polymeračního roztoku B (30% w/v akrylamid; 0,8% w/v BIS v pufru B), 6 µl TEMEDu a 120 µl peroxodisíranu amonného o koncentraci 100 mg·ml<sup>-1</sup>. Po promíchání byl tento roztok přenesen automatickou pipetou na vrstvu 10% nebo 12% separačního gelu. Do roztoků byly vsunuty plastové hřebeny, které zabezpečovaly vytvoření dávkovacích jamek v zaostřovacích gelech. Po polymeraci roztoků (přibližně 25 minut) byla skla s gely přesunuta do elektroforetické vany (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad). Vnitřní

prostor aparatury byl naplněn elektrodoým pufrem ( $0,192 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  glycín;  $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl;  $0,1\% \text{ w/v}$  SDS;  $\text{pH} = 8,3$ ). Ze zaostřovacích gelů byly vyjmuty hřebeny.

Vzorky odebrané během exprese a izolace proteinů *EcDOS* a *EcDOS-PAS* (vizte kapitoly 4.3.4 a 4.3.5) byly smíchány se čtyřikrát koncentrovaným vzorkovým redukujícím pufrem ( $0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl,  $\text{pH} = 6,8$ ;  $8\% \text{ w/v}$  SDS;  $40\% \text{ v/v}$  glycerol;  $20\% \text{ v/v}$  2-merkaptoethanol;  $0,008\% \text{ w/v}$  bromfenolová modř) a deionizovanou vodou (příprava vzorků z exprese a izolace proteinu *EcDOS* a proteinu *EcDOS-PAS* vizte tab. 4.1 a 4.2, str. 47). Vzorky byly před aplikací na gely inkubovány (Mini Heating Dry Bath Incubator, MD-MINI, Major Science) při teplotě  $100^\circ\text{C}$  po dobu pěti minut a následně krátce centrifugovány (Gilson, GmCLab). Do jamek v zaostřovacích gelech byly pipetovány vzorky (vizte tab. 4.1 a 4.2, str. 47) a  $10 \mu\text{l}$  standardu (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Unstained Standard) do jedné z jamek v každém zaostřovacím gelu. Poté byla elektroforetická aparatura uzavřena a připojena ke zdroji napětí (EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech). Elektroforéza probíhala po dobu 70 minut při napětí 200 V.

Poté, co byla elektroforéza dokončena, byla aparatura odpojena od zdroje napětí a skla s gely vyjmuta. Zaostřovací gely byly odříznuty a separační gely byly přesunuty do Petriho misek. Následně byly separační gely inkubovány po dobu jedné hodiny s barvicím roztokem InstantBlue (Expedeon, Velká Británie). Poté byly gely promyty destilovanou vodou. Nakonec byly výsledky separace zaznamenány (Perfection V550 Photo, Epson) a vyhodnoceny.

**Tab. 4.1: Příprava vzorků pro SDS-PAGE**

Vzorek	Označení vzorku na základě postupu jeho přípravy	Objem odebraného vzorku [μl]	Objem deionizované vody [μl]	Objem vzorkového pufru [μl]
Buňky před indukcí IPTG (exprese <i>EcDOS</i> i <i>EcDOS-PAS</i> )	1,3×	15,00	0	5,00
	4,0×	5,00	10,00	5,00
	10,0×	2,00	13,00	5,00
Buňky po indukcí IPTG (exprese <i>EcDOS</i> i <i>EcDOS-PAS</i> )	1,3×	15,00	0	5,00
	4,0×	5,00	10,00	5,00
	10,0×	2,00	13,00	5,00
Supernatant po ultracentrifugaci (izolace <i>EcDOS</i> i <i>EcDOS-PAS</i> )	4,0×	2,50	5,00	2,50
Eluát po afinitní chromatografii ( <i>EcDOS</i> )	1,3×	7,50	0	2,50
Eluát po afinitní chromatografii ( <i>EcDOS-PAS</i> )	2,0×	5,00	2,50	2,50

**Tab. 4.2: Příprava vzorků finálního preparátu proteinu *EcDOS* a vzorků finálního preparátu proteinu *EcDOS-PAS* pro jejich analýzu pomocí SDS-PAGE**

Vzorek	Hmotnost proteinu v jamce [μg]	Objem odebraného vzorku [μl]	Objem deionizované vody [μl]	Objem vzorkového pufru [μl]
Finální preparát proteinu <i>EcDOS</i>	1	0,50	3,25	1,25
	2	1,00	6,50	2,50
	4	2,00	13,00	5,00
Finální preparát proteinu <i>EcDOS-PAS</i>	1	0,10	3,65	1,25
	2	0,20	7,30	2,50
	4	0,40	14,60	5,00

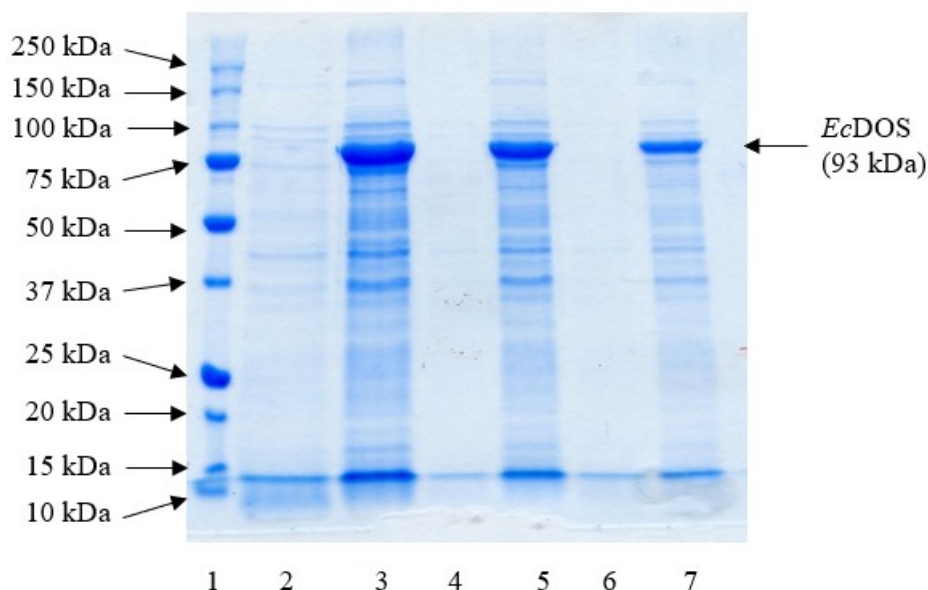
## 5 Výsledky

### 5.1 Exprese proteinů *EcDOS* a *EcDOS-PAS*

#### 5.1.1 Exprese proteinu *EcDOS*

Protein *EcDOS* v jeho plnodélkové variantě byl exprimován v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3), které byly transformovány plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS* (vizte kapitola 4.3.3). Na agarových plotnách, které obsahovaly kanamycin, se vytvořily bakteriální kolonie. Počet těchto kolonií byl výrazně vyšší v případě transformace teplotním šokem. Na agarových plotnách sloužících ke kontrole (tj. kultivace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) netransformované žádným plasmidem) se nenacházely žádné bakteriální kolonie. Z výše uvedeného vyplývá, že transformace buněk proběhla úspěšně. Následovala kultivace vybraných jednobuněčných kolonií (vizte kapitola 4.3.4), které byly transformovány teplotním šokem. V TB médiu s kanamycinem byly buňky namnoženy, aby mohly být využity pro efektivní expresi proteinu *EcDOS*. Nárůst kolonií byl proto kontrolován měřením optické hustoty při 600 nm ( $OD_{600}$ ). Po 3,5 hodinách kultivace bylo dosaženo hodnoty optické hustoty 0,8. Protože se stanovená hodnota nachází v optimálním rozsahu  $OD_{600}$  (hodnoty 0,6–1,2), mohla být indukována exprese genu pro *EcDOS* přidáním IPTG. Z 1 litru TB média bylo vyprodukováno 8,8 g buněk *E. coli* BL-21 (DE3), které obsahovaly exprimovaný protein *EcDOS*. Kontrola exprese genu pro *EcDOS* byla provedena SDS elektroforézou (vizte kapitola 4.3.8). Vzorky byly odebrány před indukcí a po indukci exprese tohoto genu (vizte obr. 5.1, str. 49). Příprava vzorků pro SDS-PAGE je uvedena v tab. 4.1 (str. 47).





**Obr. 5.1: Kontrola exprese proteinu *EcDOS* pomocí SDS-PAGE**

Příprava vzorků pro SDS-PAGE je uvedena v tab. 4.1 (str. 47).

Dráha č. 1: Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standard, 10 µl

Dráha č. 2: Buňky *E. coli* před indukcí exprese genu pro protein *EcDOS* (před přidáním IPTG)

Dráha č. 3: Buňky *E. coli* po indukci exprese genu pro protein *EcDOS* (po přidání IPTG)

Dráha č. 4: Buňky *E. coli* před indukcí exprese genu pro protein *EcDOS* (před přidáním IPTG), 4× zředěno

Dráha č. 5: Buňky *E. coli* po indukci exprese genu pro protein *EcDOS* (po přidání IPTG), 4× zředěno

Dráha č. 6: Buňky *E. coli* před indukcí exprese genu pro protein *EcDOS* (před přidáním IPTG), 10× zředěno

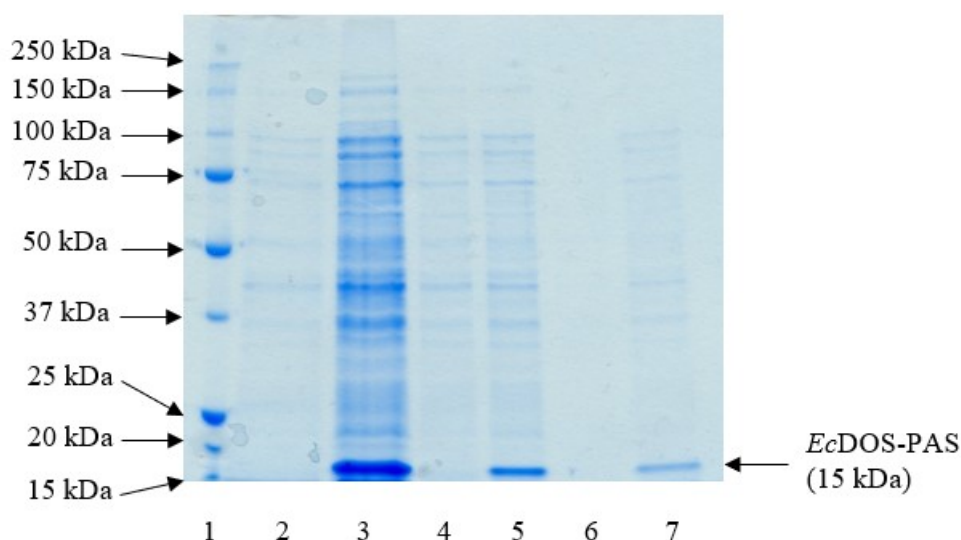
Dráha č. 7: Buňky *E. coli* po indukci exprese genu pro protein *EcDOS* (po přidání IPTG), 10× zředěno

Na obr. 5.1 je v dráze č. 1 umístěn Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standard. Dále jsou v drahách č. 2, 4 a 6 přítomny vzorky buněk *E. coli* BL-21 (DE3) před indukcí exprese *EcDOS* pomocí IPTG a v drahách č. 3, 5 a 7 vzorky po indukci exprese. Porovnáním drah č. 2 a 3 je jasné patrné, že v dráze č. 3 lze pozorovat výraznou linii proteinu o molekulové hmotnosti v intervalu 75–100 kDa, která v dráze č. 2 není přítomna. Přidáním IPTG tak zcela zjevně došlo k indukci exprese proteinu o již zmíněné molekulové hmotnosti (vizte označená šipka na obr. 5.1).

### 5.1.2 Exprese proteinu *EcDOS*-PAS

Z buněk *E. coli* BL-21 (DE3) transformovaných plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS*-PAS byl exprimován protein *EcDOS*-PAS. Transformace těchto buněk proběhla dvěma způsoby – s využitím teplotního šoku (vizte kapitola 4.3.3.2) a bez teplotního šoku (vizte

kapitola 4.3.3.1). Při transformaci bez teplotního šoku nenarostla na agarové plotně žádná bakteriální kolonie. Stejně tak tomu bylo i na plotnách sloužících jako negativní kontroly. Transformace teplotním šokem poskytla velké množství kolonií. Úspěšně tedy proběhla pouze transformace teplotním šokem. Jak je popsáno v kapitole 4.3.4, kolonie transformované teplotním šokem byly kultivovány a namnoženy v TB médiu. Nárůst kolonií byl stejně jako v případě *EcDOS* ověřován měřením  $OD_{600}$ . Její hodnota naměřená po 3,5 hodinách kultivace činila 0,9. Po dosažení této hodnoty byla indukována exprese genu pro *EcDOS-PAS* přidáním IPTG. Ze 2 litrů TB média bylo vyprodukováno 9,5 g buněk *E. coli* BL-21 (DE3), které obsahovaly exprimovaný protein *EcDOS-PAS*. Expresse genu pro *EcDOS-PAS* byla zkontrolována pomocí SDS-PAGE (vizte kapitola 4.3.8). Vzorky (příprava vizte tab. 4.1, str. 47) byly odebrány před indukcí a po indukci exprese tohoto genu. Gel SDS-PAGE je vyobrazen na obr. 5.2.



**Obr. 5.2: Kontrola exprese proteinu *EcDOS-PAS* pomocí SDS-PAGE**

Příprava vzorků pro SDS-PAGE je uvedena v tab. 4.1 (str. 47).

Dráha č. 1: Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standard, 10  $\mu$ l

Dráha č. 2: Buňky *E. coli* před indukcí exprese genu pro protein *EcDOS-PAS* (před přidáním IPTG)

Dráha č. 3: Buňky *E. coli* po indukci exprese genu pro protein *EcDOS-PAS* (po přidání IPTG)

Dráha č. 4: Buňky *E. coli* před indukcí exprese genu pro protein *EcDOS-PAS* (před přidáním IPTG), 4 $\times$  zředěno

Dráha č. 5: Buňky *E. coli* po indukci exprese genu pro protein *EcDOS-PAS* (po přidání IPTG), 4 $\times$  zředěno

Dráha č. 6: Buňky *E. coli* před indukcí exprese genu pro protein *EcDOS-PAS* (před přidáním IPTG), 10 $\times$  zředěno

Dráha č. 7: Buňky *E. coli* po indukci exprese genu pro protein *EcDOS-PAS* (po přidání IPTG), 10 $\times$  zředěno

Na obr. 5.2 (str. 50) je v dráze č. 1 umístěn Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standard. Dále jsou v drahách č. 2, 4 a 6 vzorky buněk *E. coli* BL-21 (DE3) před indukcí exprese *EcDOS*-PAS pomocí IPTG a v drahách č. 3, 5 a 7 vzorky po indukci exprese. Komparací drah č. 4 a 5 je zřejmé, že přidavkem IPTG došlo k expresi proteinu, jehož molekulová hmotnost se pohybuje kolem 15 kDa. V dráze č. 4 není přítomen téměř žádný protein s touto molekulovou hmotností. Teoretická hodnota molekulové hmotnosti proteinu *EcDOS*-PAS, která byla určena na základě jeho aminokyselinové sekvence, činí 15 kDa. V dráze č. 5 je znatelná linie exprimovaného proteinu, jehož molekulová hmotnost se pohybuje kolem 15 kDa. S největší pravděpodobností je exprimovaným proteinem právě protein *EcDOS*-PAS (vizte označená šipka na obr. 5.2, str. 50).

## **5.2 Izolace proteinů *EcDOS* a *EcDOS*-PAS z buněk *E. coli* BL-21 (DE3)**

### **5.2.1 Izolace proteinu *EcDOS* z buněk *E. coli* BL-21 (DE3)**

Izolace senzorového hemoproteinu *EcDOS* byla provedena podle postupu popsánoho v kapitole 4.3.5. Během izolace byly odebrány vzorky, jež byly následně analyzovány pomocí SDS elektroforézy (vizte obr. 5.3, str. 52). Příprava vzorků pro SDS-PAGE je uvedena v tab. 4.1 a 4.2 (str. 47).

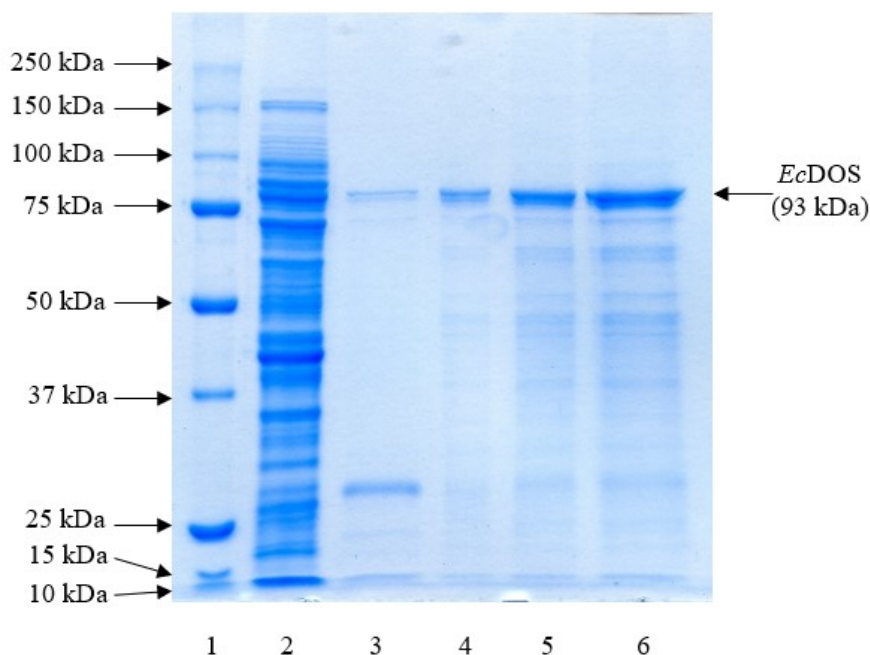
Na obr. 5.3 (str. 52) je v dráze č. 1 umístěn Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standard. Do dráhy č. 2 byl nanesen vzorek supernatantu, který byl získán centrifugací kompetentních buněk *E. coli* BL-21 (DE3) na analytické ultracentrifuze. V celé této dráze je patrné velké množství linií, které představují jednotlivé bakteriální proteiny. Tyto linie jsou od sebe vzájemně dobře rozeznatelné.

Dalším krokem při izolaci proteinu *EcDOS* byla afinitní chromatografie, která slouží k oddělení proteinu *EcDOS* od jiných cytosolárních proteinů. Jako afinitní nosič byl použit TALON Superflow. Z tohoto nosiče byl *EcDOS* eluován elučním pufrem, který obsahoval vysokou koncentraci imidazolu. Vzorek eluátu po afinitní chromatografii byl nanesen do dráhy č. 3, obr. 5.3 (str. 52). V této dráze je nepřiliš viditelná slabá linie proteinu v rozsahu molekulové hmotnosti 75–100 kDa, která pravděpodobně odpovídá proteinu *EcDOS*. Dále je viditelná linie v úrovni mezi 25–37 kDa.

Následně byl vzorek proteinu *EcDOS* zakoncentrován. Následovala gelová chromatografie, která se uplatňuje pro odstranění imidazolu z eluátu po afinitní chromatografii a zároveň pro konečnou purifikaci preparátu proteinu. Záznam separace proteinu *EcDOS* pomocí gelové chromatografie je vyobrazen na obr. 5.4 (str. 53). Na

základě kontinuálně měřených absorbancí byly odejmuty frakce s maximální absorbancí při 280 nm, které obsahovaly protein *EcDOS*. Frakce byly odebírány po 400  $\mu$ l v intervalu elučních objemů 9,2 až 13,6 ml. Odejmuté frakce byly pomocí centrifugačních filtrů zakonzentrovány na výsledný objem 250  $\mu$ l.

V drahách č. 4, 5 a 6 na obr. 5.3 jsou přítomny vzorky finálního preparátu proteinu *EcDOS* o různých hmotnostech (postupně 1  $\mu$ g, 2  $\mu$ g a 4  $\mu$ g). V těchto drahách jsou zřetelné linie proteinu s molekulovou hmotností v rozmezí 75–100 kDa. Jak již bylo zmíněno výše, teoretická hodnota molekulové hmotnosti proteinu *EcDOS* je 93 kDa. Srovnáním mobilit standardů (75 kDa a 100 kDa) s mobilitou finálního preparátu proteinu je zřejmé, že linie odpovídající izolovanému proteinu spadá právě do rozmezí molekulových hmotností 75–100 kDa. Lze tedy předpokládat, že izolovaným proteinem je pravděpodobně *EcDOS*.



**Obr. 5.3: Kontrola izolace proteinu *EcDOS* pomocí SDS-PAGE**

Příprava vzorků pro SDS-PAGE je uvedena v tab. 4.1 a 4.2 (str. 47).

Dráha č. 1: Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standard, 10  $\mu$ l

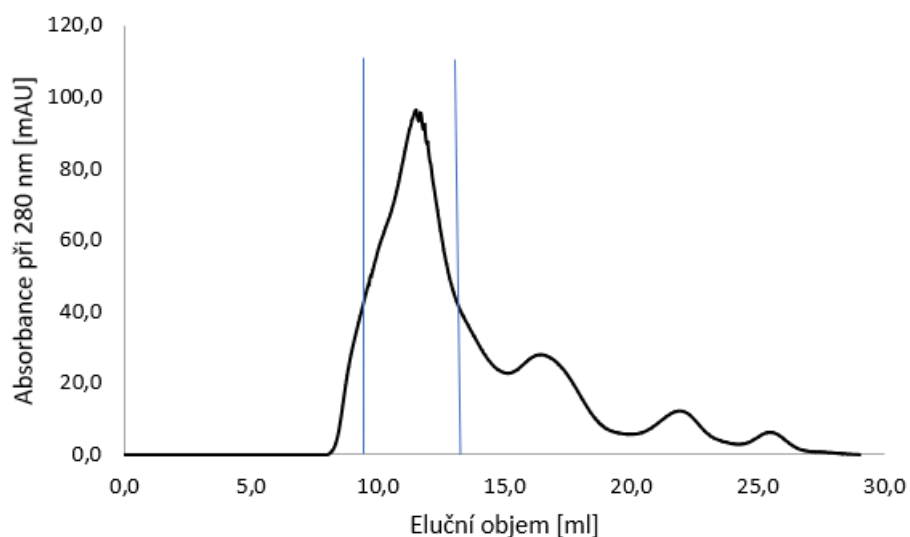
Dráha č. 2: Supernatant získaný sonikací kompetentních buněk *E. coli* BL-21 (DE3) a následnou ultracentrifugací, 4 $\times$  zředěn

Dráha č. 3: Vzorek eluátu po afinitní chromatografii

Dráha č. 4: Finální preparát proteinu *EcDOS*, množství celkového proteinu aplikovaného do jamky zaostřovacího gelu je 1  $\mu$ g

Dráha č. 5: Finální preparát proteinu *EcDOS*, množství celkového proteinu aplikovaného do jamky zaostřovacího gelu je 2  $\mu$ g

Dráha č. 6: Finální preparát proteinu *EcDOS*, množství celkového proteinu aplikovaného do jamky zaostřovacího gelu je 4  $\mu$ g



**Obr. 5.4: Záznam gelové chromatografie použité při separaci proteinu *EcDOS***

Na základě spektrofotometrické detekce při vlnové délce 280 nm byly odebrány frakce v intervalu elučních objemů 9,2 až 13,6 ml (interval označen modrými čarami), které obsahovaly finální preparát proteinu *EcDOS*.

### 5.2.2 Izolace proteinu *EcDOS-PAS* z buněk *E. coli* BL-21 (DE3)

Postup izolace proteinu *EcDOS-PAS* je uveden v kapitole 4.3.5. Během izolace byly odebrány vzorky, které byly následně analyzovány pomocí SDS elektroforézy (vizte obr. 5.5, str. 55). Příprava vzorků pro SDS-PAGE je uvedena v tab. 4.1 a 4.2 (str. 47).

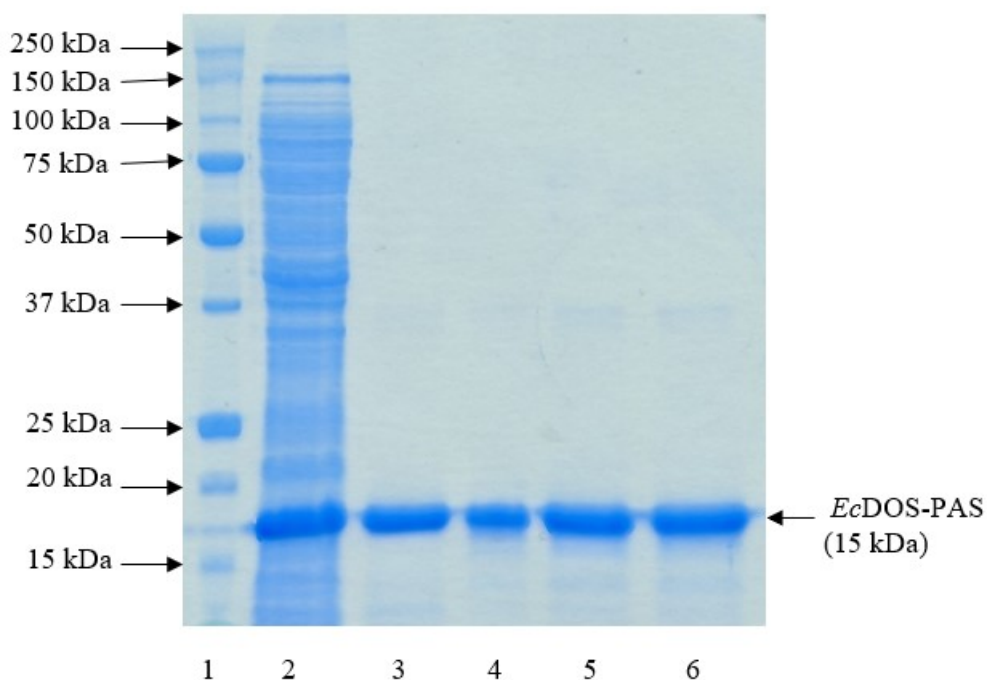
Na obr. 5.5 (str. 55) je v dráze č. 1 umístěn Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standard. V dráze č. 2 je přítomen supernatant získaný sonikací kompetentních buněk *E. coli* BL-21 (DE3) a následnou ultracentrifugací. Z analýzy vzorku v dráze č. 2 je patrné, že kompetentní buňky *E. coli* BL-21 (DE3) obsahují rekombinantní exprimovaný protein *EcDOS-PAS* převážně v cytosolu. V délce celé této dráhy jsou pozorovatelné linie, které jsou zodpovědné za bakteriální proteiny. Linie odpovídající jednotlivým proteinům jsou méně rozlišitelné než linie na gelu SDS-PAGE určeném pro kontrolu izolace *EcDOS* (obr. 5.3, str. 52). Nejsilnější z linií v dráze č. 2 na obr. 5.5 (str. 55) se vyskytuje v intervalu molekulových hmotností 15–20 kDa. Jedná se tedy pravděpodobně o protein *EcDOS-PAS* (jeho teoretická molekulová hmotnost je 15 kDa).

Další izolačním krokem byla afinitní chromatografie. V dráze č. 3, obr. 5.5 (str. 55) je přítomen vzorek eluátu po afinitní chromatografii. V této dráze se nachází jediná velice výrazná linie proteinu v rozmezí molekulových hmotností 15–20 kDa. Jak je patrné ze šířky této linie, byl tento vzorek pravděpodobně nanesen na gel ve velmi vysoké

koncentraci (přesto, že vzorek byl 2x zředěn). Porovnáním této linie s linií neředěného vzorku v dráze č. 3 na obr. 5.3 (str. 52), která pravděpodobně odpovídá proteinu *EcDOS*, je zřejmé, že výtěžek izolace proteinu *EcDOS*-PAS bude vyšší než výtěžek izolace proteinu *EcDOS*.

Vzhledem k tomu, že výtěžek proteinu *EcDOS*-PAS je velký, nebylo možné provést gelovou chromatografii celého preparátu najednou, ale musela být rozdělena do dvou separací. Záznam první gelové chromatografie proteinu *EcDOS*-PAS je vyobrazen na obr. 5.6 (str. 56). Druhá separace měla záznam velmi podobný. Podmínky separace byly stejné jako v případě izolace *EcDOS*. Detekce byla prováděna spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Na základě tohoto měření byly odebírány (při první i druhé separaci vzorku) frakce o objemu 500  $\mu$ l, které vykazovaly maximální absorbanci právě při 280 nm. Odebrané frakce obsahovaly protein *EcDOS*-PAS. Při první separaci byly odebrány frakce v rozmezí elučních objemů 16,0 až 18,5 ml. Při druhé separaci vzorku byly odebrány frakce ve stejném rozmezí elučních objemů. Frakce z obou separací byly spojeny a zakoncentrovány na výsledný objem 700  $\mu$ l.

Na obr. 5.5 (str. 55) v drahách č. 4, 5 a 6 jsou vyobrazeny vzorky finálního preparátu proteinu *EcDOS*-PAS, které byly do těchto drah naneseny v různých hmotnostech (postupně 1  $\mu$ g, 2  $\mu$ g a 4  $\mu$ g). Ve všech těchto drahách je patrná pouze jedna hlavní linie odpovídající proteinu, jehož molekulová hmotnost se pohybuje mezi 15–20 kDa (zjištěno z porovnání mobilit standardů s mobilitou finálního preparátu). Jak již bylo zmíněno výše, teoretická hodnota molekulové hmotnosti proteinu *EcDOS*-PAS je 15 kDa. S největší pravděpodobností lze tedy předpokládat, že se jedná právě o protein *EcDOS*-PAS. Tento protein zanechává ve všech třech drahách (č. 4, 5 a 6, obr. 5.5, str. 55) velmi výraznou stopu. Rozdíl je ještě znatelnější porovnáním se vzorky finálního preparátu proteinu *EcDOS* na elektroforetickém gelu (dráhy č. 4, 5 a 6, obr. 5.3, str. 52). Lze tedy očekávat, že výtěžek izolace proteinu *EcDOS*-PAS bude velký.



**Obr. 5.5: Kontrola izolace proteinu *EcDOS-PAS* pomocí SDS-PAGE**

Příprava vzorků pro SDS-PAGE je uvedena v tab. 4.1 a 4.2 (str. 47).

Dráha č. 1: Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standard, 10  $\mu$ l

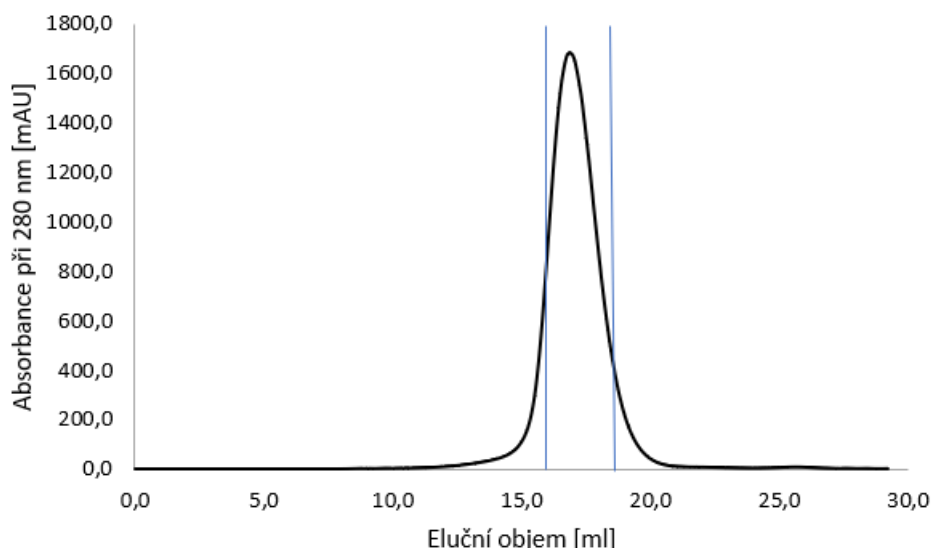
Dráha č. 2: Supernatant získaný sonikací kompetentních buněk *E. coli* BL-21 (DE3) a následnou ultracentrifugací, 4 $\times$  zředěn

Dráha č. 3: Vzorek eluátu po afinitní chromatografii, 2 $\times$  zředěn

Dráha č. 4: Finální preparát proteinu *EcDOS-PAS*, množství celkového proteinu aplikovaného do jamky zaostřovacího gelu je 1  $\mu$ g

Dráha č. 5: Finální preparát proteinu *EcDOS-PAS*, množství celkového proteinu aplikovaného do jamky zaostřovacího gelu je 2  $\mu$ g

Dráha č. 6: Finální preparát proteinu *EcDOS-PAS*, množství celkového proteinu aplikovaného do jamky zaostřovacího gelu je 4  $\mu$ g



**Obr. 5.6: Záznam gelové chromatografie použité při separaci proteinu *EcDOS-PAS* (první separace vzorku)**

Na základě spektrofotometrické detekce při vlnové délce 280 nm byly odebrány frakce v intervalu elučních objemů 16,0 až 18,5 ml (interval označen modrými čarami), které obsahovaly finální preparát proteinu *EcDOS-PAS*.

### 5.3 Charakterizace proteinů *EcDOS* a *EcDOS-PAS*

Ve finálních preparátech proteinů *EcDOS* a *EcDOS-PAS* byla stanovena jejich koncentrace pomocí spektrofotometru DS-11 DeNovix (vizte kapitola 4.3.6). Čistota izolovaných preparátů byla ověřena SDS elektroforézou (vizte kapitola 4.3.8). Dále bylo v případě preparátů obou proteinů změřeno jejich absorpční spektrum v UV/VIS oblasti pomocí spektrofotometru Cary 60 UV-VIS, Agilent Technologies (vizte kapitola 4.3.7). Spektra byla naměřena s centrálním iontem železa hemoproteinů *EcDOS* i *EcDOS-PAS* ve stavu Fe(III) a Fe(II), dále Fe(II)-CO. V případě *EcDOS-PAS* bylo změřeno také spektrum s centrálním iontem železa proteinu ve stavu Fe(II)-O<sub>2</sub>.

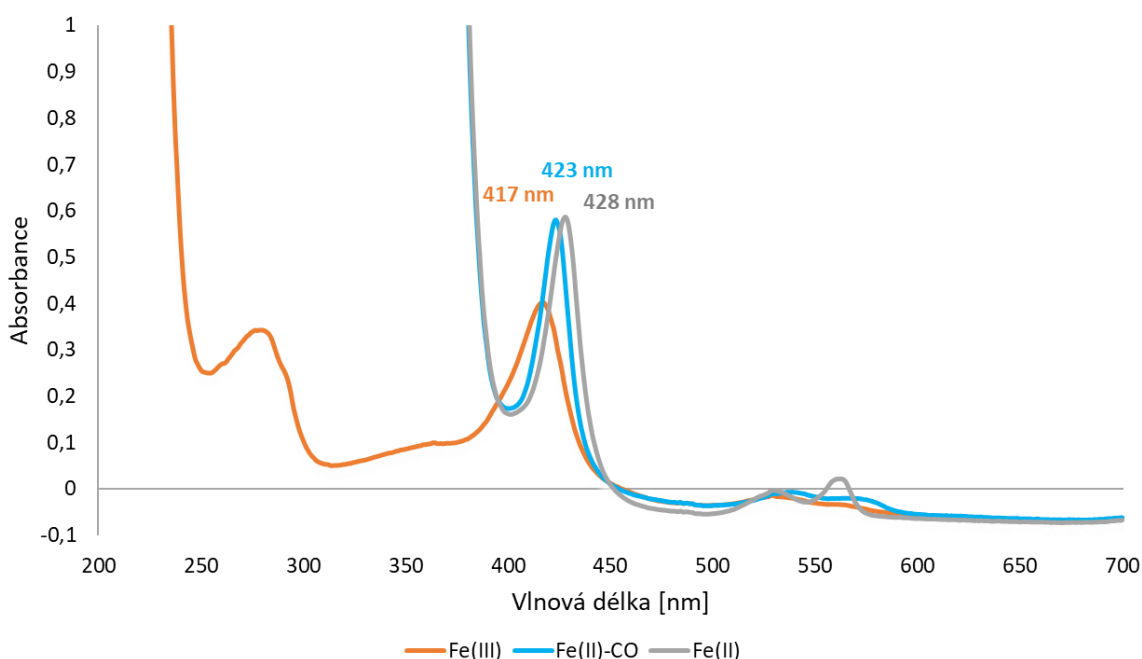
#### 5.3.1 Charakterizace proteinu *EcDOS*

Celková koncentrace proteinu *EcDOS* v preparátu činila 2,154 mg·ml<sup>-1</sup>. Čistota izolovaného preparátu byla z intenzity linie v dráze č. 4 na obrázku 5.3 (str. 52) odhadnuta na 85–90 %. Ze znalosti teoretické hodnoty relativní molekulové hmotnosti tohoto proteinu ( $M_r = 93\,004$ ) byla určena jeho molární koncentrace v preparátu jako 23,16 μmol·l<sup>-1</sup>. Z 1 litru TB média bylo získáno 0,538 mg finálního preparátu proteinu



*EcDOS* a z jednoho gramu buněk *E. coli* BL-21 (DE3) bylo získáno 0,061 mg finálního preparátu proteinu *EcDOS*.

Absorpční spektra preparátu s proteinem *EcDOS* byla měřena v rozmezí vlnových délek 200 až 700 nm. Jak je uvedeno v kapitole 4.3.7, nejprve bylo změřeno spektrum proteinu v nativním stavu (obr. 5.7, červená křivka), poté bylo změřeno spektrum proteinu po redukci iontu železa hemu dithioničitanem sodným (obr. 5.7, šedá křivka) a nakonec spektrum redukovaného proteinu po jeho interakci s CO (obr. 5.7, modrá křivka). Analýzou spektra proteinu *EcDOS* v nativním stavu byl zjištěn jeho Soretův pás v oblasti 417 nm. Soretův pás hemoproteinu *EcDOS* po redukci iontu železa hemu se nachází v oblasti 428 nm a oblast Soretova pásu *EcDOS* ve stavu Fe(II)-CO byl pozorován při 423 nm. Q-pásky  $\alpha$  a  $\beta$  proteinu v nativním stavu byly nalezeny při 528 nm a 559 nm. Q-pásky  $\alpha$  a  $\beta$  hemoproteinu po redukci iontu železa hemu se vyskytují v oblasti 530 nm a 561 nm a oblasti Q-pásů  $\alpha$  a  $\beta$  *EcDOS* ve stavu Fe(II)-CO byly zjištěny při 539 nm a 566 nm.



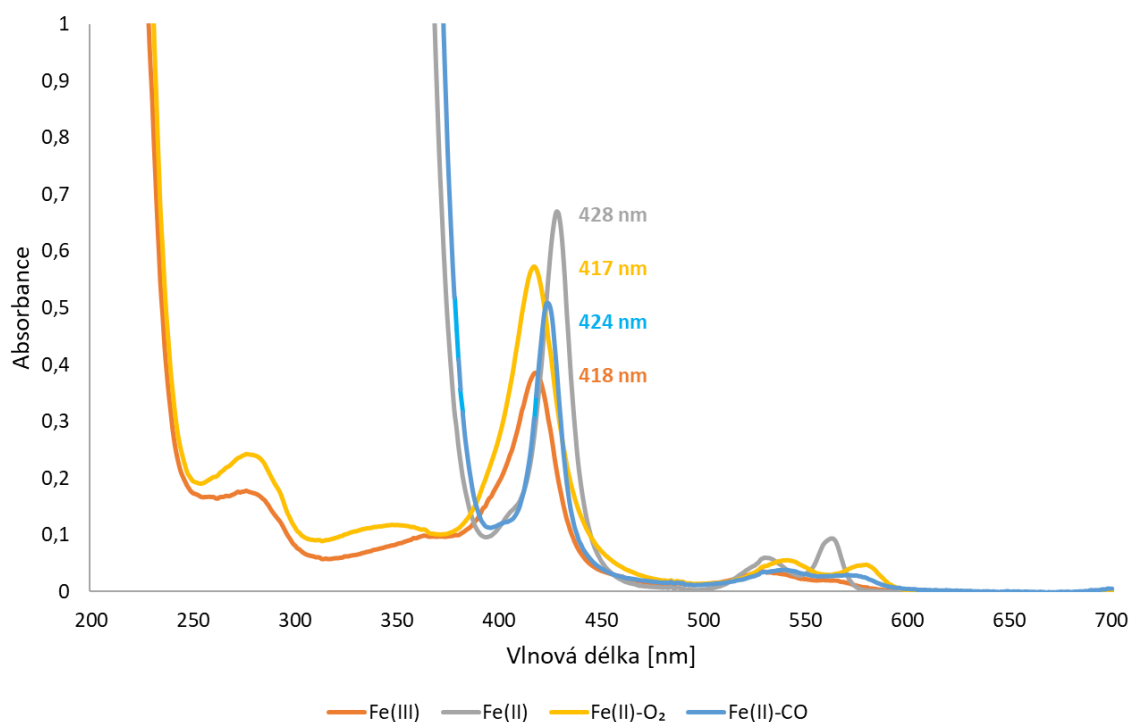
**Obr. 5.7: Absorpční spektrum finálního preparátu proteinu *EcDOS***

Spektrum *EcDOS* s iontem železa hemu ve stavu Fe(III) je vyznačeno červenou křivkou, ve stavu Fe(II) je znázorněno šedou křivkou a ve stavu Fe(II)-CO označeno modrou křivkou. V grafu jsou také uvedeny hodnoty Soretova pásu pro spektra všech forem proteinu.

### 5.3.2 Charakterizace proteinu *EcDOS-PAS*

Celková koncentrace proteinu *EcDOS-PAS* v preparátu činila  $10,324 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Čistota izolovaného preparátu byla z intenzity linie v dráze č. 4 na obr. 5.5 (str. 55) odhadnuta na přibližně 99 %. Ze znalosti teoretické hodnoty relativní molekulové hmotnosti tohoto proteinu ( $M_r = 15\,146$ ) byla určena jeho molární koncentrace v preparátu jako  $681,6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Z 1 litru TB média bylo získáno 3,613 mg finálního preparátu proteinu *EcDOS-PAS* a z 1 g buněk *E. coli* BL-21 (DE3) bylo získáno 0,761 mg finálního preparátu proteinu *EcDOS-PAS*.

Absorpční spektra preparátu s proteinem *EcDOS-PAS* byla změřena v rozmezí vlnových délek 200 až 700 nm. Jak je uvedeno v kapitole 4.3.7, nejprve bylo změřeno spektrum proteinu v nativním stavu (obr. 5.8, str. 59, červená křivka), poté bylo změřeno spektrum proteinu po redukci iontu železa hemu dithioničitanem sodným (obr. 5.8, šedá křivka) a potom byla změřena spektrum redukováného proteinu po jeho interakci s CO (obr. 5.8, modrá křivka). Nakonec bylo změřeno spektrum proteinu s redukováným iontem železa hemu po jeho interakci s O<sub>2</sub> (obr. 5.8, žlutá křivka). Analýzou spektra proteinu *EcDOS-PAS* v nativním stavu byl nalezen jeho Soretův pás v oblasti 418 nm. Soretův pás hemoproteinu *EcDOS-PAS* po redukci iontu železa hemu se nachází v oblasti 428 nm a oblast Soretova pásu *EcDOS-PAS* ve stavu Fe(II)-CO byla pozorována při 424 nm. Pro *EcDOS-PAS* s Fe(II)-O<sub>2</sub> se oblast Soretova pásu vyskytuje při 417 nm. Q-pásky  $\alpha$  a  $\beta$  proteinu v nativním stavu byly nalezeny při 528 nm a 559 nm. Q-pásky  $\alpha$  a  $\beta$  hemoproteinu po redukci železa hemu se vyskytují v oblasti 530 nm a 563 nm a oblasti Q-pásů  $\alpha$  a  $\beta$  *EcDOS-PAS* ve stavu Fe(II)-CO byly zjištěny při 539 nm a 570 nm. Q-pásky  $\alpha$  a  $\beta$  *EcDOS-PAS* s Fe(II)-O<sub>2</sub> se nacházejí při 539 nm a 580 nm.



**Obr. 5.8: Absorpční spektrum finálního preparátu proteinu *EcDOS-PAS***

Spektrum *EcDOS-PAS* s iontem železa hemu ve stavu Fe(III) je vyznačeno červenou křivkou, ve stavu Fe(II) je znázorněno šedou křivkou, ve stavu Fe(II)-O<sub>2</sub> označeno žlutou křivkou a ve stavu Fe(II)-CO modrou křivkou. V grafu jsou také uvedeny hodnoty Soretova pásu pro spektra všech forem proteinu.

## 6 Diskuse

Součástí této bakalářské práce je shrnutí dosavadních publikovaných poznatků týkajících se hemových sensorových proteinů. Sensorové proteiny, které detekují plyny, jsou typicky zastoupeny v bakteriálních organismech a účastní se regulace mnoha významných procesů (například virulence, sporulace, tvorby biofilmů) s dopadem na lidské zdraví, pokud jsou lidé těmto bakteriím vystaveny [1,25,36]. Přestože se dané proteiny účastní tak zásadních procesů, které mají vliv na lidské zdraví, mechanismus působení (přenos signálu ze sensorové do funkční domény) těchto proteinů bohužel není dosud plně odhalen. Mezi bakteriální senzory patří protein *EcDOS*, který je předmětem studia experimentální části této bakalářské práce. Zmíněný protein byl podrobněji popsán již v roce 2000, kdy bylo zjištěno, že se jedná o kyslíkový senzor [2]. Protein *EcDOS* je klíčový pro přežití bakteriálních organismů prostřednictvím regulace homeostázy c-di-GMP, který se uplatňuje jako druhý posel například při regulaci dělení buněk či jejich vzájemné komunikaci [24,52,53]. V rámci této bakalářské práce byl exprimován a izolován protein *EcDOS* z buněk *E. coli* BL-21 (DE3). Také byla připravena jeho izolovaná doména s PAS strukturou (*EcDOS*-PAS).

Laboratoř, ve které byla zpracována experimentální část této bakalářské práce, se v minulosti intenzivně zabývala studiem jiných prokaryotických sensorových systémů, zejména histidinkinasou *AfGcHK* [48,68] a diguanylátcyklasou *YddV* [69]. *AfGcHK* i *YddV* jsou kyslíkovými senzory se sensorovou globinovou doménou [24,48]. Protein *EcDOS* je také kyslíkovým senzorem, ale obsahuje sensorovou doménu s PAS strukturou [2]. Pro svoji odlišnost od *AfGcHK* a *YddV* byl *EcDOS* vybrán jako předmět studia této bakalářské práce za účelem doplnění informací o mechanismu přenosu signálu, a hlavně se záměrem srovnání vlastností sensorových proteinů s globinovou a PAS strukturou sensorové domény.

Prvním z úkolů bakalářské práce byla exprese dvou modelových proteinů (*EcDOS* a *EcDOS*-PAS). Z obr. 5.1 (str. 49) a 5.2 (str. 50) je patrné, že exprese byla úspěšná. Dráhy elektroforetického gelu se vzorky před indukcí exprese (tj. dráhy č. 2, 4 a 6) totiž neobsahují linie proteinů, které odpovídají teoretickým molekulovým hmotnostem zvolených proteinů (zjištěným z jejich aminokyselinové sekvence). Avšak po indukci exprese modelových proteinů (dráhy č. 3, 5 a 7) jsou tyto linie již jasně patrné. Hmotnost získaných buněk *E. coli* s exprimovanými proteiny se pohybovala v řádech jednotek

gramů na 1 litr média. Jednalo se tedy o množství materiálu, se kterým bylo dále možné pracovat. Toto množství bylo navíc srovnatelné s množstvím buněk získaných v rámci jiných studií prokaryotických proteinů (YddV [69] a AfGcHK [70]). Hmotnost buněk *E. coli* s exprimovaným eukaryotickým proteinem (HRI) byla mnohem nižší [16], což mohlo být dáno vlivem tohoto proteinu na dělení a vitalitu buněk *E. coli*.

V případě analýzy vzorku exprimovaného proteinu *EcDOS* (vizte dráha č. 2, obr. 5.3, str. 52) lze na elektroforetickém gelu pozorovat řadu dalších cytosolárních proteinů *E. coli*. Oproti těmto proteinům je však ve vzorku preparátu cytosolu buněk *E. coli* exprimujících *EcDOS* relativně výrazně méně daného proteinu. V případě *EcDOS*-PAS je obsaženo v cytosolu *E. coli* relativně výrazně více daného rekombinantního proteinu, a proto v dráze č. 2 na obr. 5.5 (str. 55) lze pozorovat relativně málo dalších cytosolárních proteinů a dominanci daného rekombinantního proteinu. Z tohoto pozorování by mohl vyplývat závěr, že míra exprese *EcDOS* byla nižší než míra exprese *EcDOS*-PAS. Tento závěr je také ve shodě se zhodnocením celkového výtěžku obou proteinů (vizte dále).

Dalším úkolem této bakalářské práce byla izolace modelových proteinů. Jeden z nejdůležitějších kroků izolace proteinů *EcDOS* a *EcDOS*-PAS byla afinitní chromatografie. Použité plasmidy byly proto upraveny tak, aby exprimovaný protein *EcDOS*, resp. *EcDOS*-PAS obsahoval histidinovou kotvu (sekvence šesti a více histidinů umístěných za sebou) ve své N-terminální části. Při afinitní chromatografii vznikla vazba histidinové kotvy s kobaltnatým kationtem, který byl přítomen v afinitním nosiči. Z tohoto nosiče byly proteiny eluovány elučním pufrem, který obsahoval vysokou koncentraci imidazolu, jenž slouží jako kompetitivní činidlo kobaltnatým kationtům [63,71]. V případě proteinu *EcDOS*-PAS (vizte dráha č. 3, obr. 5.5, str. 55) se tento přístup ukázal jako úspěšný. Protein *EcDOS* (vizte dráha č. 3, obr. 5.3, str. 52) byl kontaminován proteinem, jehož molekulová hmotnost se pohybovala mezi 25 kDa a 37 kDa. Je pravděpodobné, že se jednalo se o bakteriální protein, který měl bohaté zastoupení histidinů ve své sekvenci. Mohlo by se ale také jednat o kontaminantu, která byla způsobena degradací proteinu *EcDOS* například působením proteas buněk *E. coli*, ve kterých docházelo k expresi *EcDOS*. Neznámý protein by mohl být identifikován například hmotnostní spektrometrií. Zjistila by se tak část sekvence dané kontaminanty a následně by se její sekvence porovnála se sekvencí proteinu *EcDOS*, čímž by se zjistilo, zda se jedná o fragment tohoto proteinu či jiný protein bohatý na histidin. Každopádně

byla většina tohoto kontaminujícího proteinu odstraněna v posledním izolačním kroku, pomocí gelové chromatografie.

Výtěžek izolace proteinu *EcDOS*-PAS vztažený na 1 litr TB média byl přibližně 7× vyšší než analogický výtěžek proteinu *EcDOS*. V případě výtěžků izolace proteinů z jednoho gramu buněk *E. coli* BL-21(DE3), byl tento výtěžek pro *EcDOS*-PAS dokonce 12× vyšší než analogický výtěžek pro *EcDOS*. Jedním z vysvětlení pozorování, že výtěžek *EcDOS*-PAS byl tolikrát vyšší než výtěžek *EcDOS*, by mohla být skutečnost, že aminokyselinová sekvence izolované PAS domény [67] je přibližně šestkrát kratší než sekvence plnodélkového proteinu *EcDOS* [67]. Proteiny s kratší aminokyselinovou sekvencí se logicky v buňkách exprimují kratší čas a za stejný čas jich buňka exprimuje více než proteinů dlouhých. Obecně se zdá, že kratší proteiny se rekombinantní expresí připravují většinou jednodušeji a ve vyšším výtěžku než proteiny dlouhé [72]. Navíc je struktura izolované PAS domény poměrně rigidní a kompaktní. Například protein PpsR (z anglického názvu „**p**hotopigment **s**uppressor **p**rotein **R**“), který pochází z bakterie *Rhodobacter sphaeroides*, obsahuje rigidní PAS doménu [73]. Oproti izolované PAS doméně je plnodélkový protein *EcDOS* poměrně flexibilní, je tedy složitější a časově náročnější, aby se po expresi jeho proteinový řetězec správně uspořádal v prostoru, resp. v roztoku [51]. Přestože výše popsané problémy pravděpodobně ovlivní výtěžek *EcDOS*, pravděpodobně nemají vliv na kvalitu získaného preparátu. Protein *EcDOS* připravený obdobným způsobem vykazoval enzymovou aktivitu, což potvrzuje, že byl připraven ve svém nativním stavu [74]. Také jiné laboratoře připravily odlišný preparát tohoto plnodélkového proteinu, který byl natolik stabilní, že si zachoval svoji aktivitu i po inkorporaci do mezoporézního materiálu [75].

Výtěžek izolace proteinu *EcDOS* byl řádově nižší oproti prokaryotickému proteinu YddV [69]. V případě *EcDOS*-PAS byl výtěžek několikrát nižší. Zmíněný preparát proteinu YddV byl připraven v tak vysokém výtěžku pravděpodobně proto, že k němu byl připojen maltosu vázající protein, který slouží jako kotva na N-konci proteinu YddV [69]. Tato kotva se používá mimo jiné v případě, kdy je exprese proteinu problematická a v případě proteinu YddV se zjevně tato strategie osvědčila. Při srovnání s výtěžkem eukaryotického proteinu HRI [16] je výtěžek proteinu *EcDOS* řádově vyšší. Pro *EcDOS*-PAS je výtěžek téměř o dva řády vyšší než výtěžek proteinu HRI. Tato skutečnost je ve shodě s obecným pozorováním, že se rekombinantní prokaryotické proteiny připravují jednodušeji než proteiny eukaryotické [76].

Protein *EcDOS* ( $M = 93$  kDa) má přibližně  $6,2\times$  větší molekulovou hmotnost než protein *EcDOS-PAS* ( $M = 15$  kDa). Molekulové hmotnosti obou proteinů byly zjištěny na základě jejich aminokyselinových sekvencí [67]. Na záznamu SDS-PAGE (vizte obr. 5.3, dráhy č. 4–6, str. 52) jsou patrné linie, které odpovídá mobilitě v rozmezí mobilit určených pro standardní proteiny s molekulovou hmotností 75 kDa a 100 kDa. V tomto rozmezí se nachází také molekulová hmotnost proteinu *EcDOS*. Záznam SDS-PAGE pro *EcDOS-PAS* je zobrazen na obr. 5.5 (str. 55), dráhy č. 4–6. Linie odpovídající proteinu *EcDOS-PAS* se nacházejí přibližně uprostřed mezi signály poskytnutými standardními proteiny s molekulovou hmotností 15 kDa a 20 kDa. Jelikož je však molekulová hmotnost *EcDOS-PAS* určená z jeho aminokyselinové sekvence 15 kDa, dalo by se tedy předpokládat, že mobilita PAS domény bude srovnatelná s mobilitou stejně velkého standardního proteinu. Nicméně bylo pozorováno, že za podmínek provedení SDS elektroforézy je mobilita PAS domény nižší, než bylo původně očekáváno. To mohlo být způsobeno například fosforylací proteinu nebo jinou posttranslační modifikací proteinu. Dalším možným vysvětlením je přítomnost histidinové kotvy, která nebyla zahrnuta při výpočtu teoretické molekulové hmotnosti proteinu *EcDOS-PAS*.

Jedním z kroků izolace proteinů byla také gelová chromatografie. Vzhledem k tomu, že se liší teoretické molekulové hmotnosti obou studovaných proteinů, nebylo překvapující, že se liší také jejich eluční objemy. V případě *EcDOS* je to přibližně 11,5 ml a pro *EcDOS-PAS* 17,3 ml. Z kalibrace použité kolony [69] je zřejmé, že pozorované eluční objemy daných proteinů odpovídají přibližně dvojnásobku daných teoretických molekulových hmotností. Z toho lze tedy vyvodit, že se oba proteiny vyskytují v roztoku převážně ve formě svých dimerů. Dimerizace plnodélkového proteinu (*EcDOS*) i izolované domény (*EcDOS-PAS*) jsou ve shodě s publikovanými výsledky [77]. Podle jiné studie [78] tvoří plnodélkový protein *EcDOS* dokonce za specifických okolností tetramer. Vyšší oligomerní stavy jsou pro většinu sensorových hemoproteinů typické, převažují dimerní formy, příkladem mohou být proteiny *AfGcHK* [48] a *YddV* [69].

Protein *EcDOS* byl předběžně spektrofotometricky charakterizován. Zjištěné poznatky byly porovnány s několika studiemi [2,61,62]. Oblast Soretova pásu proteinu v nativním stavu (417 nm) je ve shodě s publikovanými výsledky [2,61,62]. Oblast Soretova pásu proteinu po redukci iontu železa hemu (428 nm) a proteinu ve stavu Fe(II)-CO (423 nm) je také shodná s dostupnými daty [61,62]. Zóny Q-pásů ve viditelné oblasti byly velmi podobné jako údaje dostupné v literatuře [2,62].

Naměřená UV/VIS spektra proteinu *EcDOS*-PAS byla také porovnána s dostupnými výsledky [61,62]. Zjištěné oblasti Soretova pásu proteinu s redukováným iontem železa hemu, resp. proteinu ve stavu Fe(II)-O<sub>2</sub> jsou naprosto shodné s údaji v literatuře [61,62]. V případě proteinu v nativním stavu, resp. proteinu ve stavu Fe(II)-CO se výsledky liší pouze o 1 nm, což je možné přisoudit experimentální chybě provedení tohoto experimentu. Také oblasti Q-pásů všech forem proteinu *EcDOS*-PAS se od publikovaných výsledků [61,62] jen nepatrně liší. Jediný větší rozdíl činil 5 nm. Tento rozdíl lze připsat akceptovatelné experimentální odchylce. Určení charakteristické vlnové délky Soretova pásu je většinou daleko přesnější z důvodu výrazné intenzity tohoto pásu na rozdíl od až o dva řády nižší intenzity Q-pásů.

Soretovy pásy a Q-pásy absorpčních spekter obou proteinů *EcDOS* a *EcDOS*-PAS v UV/VIS oblasti byly nalezeny při podobných hodnotách vlnových délek. Zdá se tedy, že způsob koordinace iontu železa hemu v obou proteinech je stejný a izolace senzorové domény z plnodélkového proteinu neovlivnila bezprostřední okolí hemu.

Dále byly srovnány zjištěné vlnové délky Soretova pásu s údaji o dalších hemoproteinech s PAS doménou. Mezi zástupce těchto PAS proteinů patří kyslíkový senzor vykazující kinasovou aktivitu z *Rhizobium meliloti* FixL [2,61,62] a fosfodiesterasa A1 z *Acetobacter xylinum* AxPDEA1 [31,62]. Nejvýraznější rozdíly byly zaznamenány pro oblasti Soretova pásu proteinů *EcDOS* a FixL v nativním stavu [2,61,62]. Soretův pás proteinu FixL v nativním stavu byl nalezen při vlnové délce 395 nm, kdežto zjištěná vlnová délka Soretova pásu proteinu *EcDOS* byla při 417 nm. Tento rozdíl je pravděpodobně zapříčiněn tím, že komplexy *EcDOS* s iontem železa hemu ve stavu Fe(II) nebo Fe(III) jsou typicky hexakoordinované a nízkospinové, zatímco analogické komplexy proteinu FixL jsou pentakoordinované a vysokospinové [62]. Vlnové délky oblastí Soretova pásu proteinu AxPDEA1 ve stavu Fe(II) a Fe(II)-CO jsou velmi podobné analogickým oblastem pásů *EcDOS* [62].

Vlnové délky Soretova pásu všech forem *EcDOS* se nepříliš liší od publikovaných studií pro všechny formy proteinů DosS a DosT, které obsahují GAF doménu [79]. Oblast Soretova pásu proteinu DosS [79] v nativním stavu se vyskytovala při 409 nm a proteinu DosT [79] v nativním stavu při 412 nm, zatímco v případě *EcDOS* se tato oblast nacházela při 417 nm. Vlnové délky Soretova pásu proteinů DosS a DosT naznačují, že jsou tyto proteiny v nativním stavu hexakoordinované [79], stejně jako je tomu v případě proteinu *EcDOS* v nativním stavu [62].



Pro úplnou přehlednost zbývá porovnání charakteristických vlnových délek Soretova pásu *EcDOS* se sensorovými proteiny obsahujícími globinovou strukturu sensorové domény (*AfGcHK* [80] a *YddV* [54]). Protein *EcDOS* vykazuje s proteinem *AfGcHK* [80] podobné hodnoty vlnových délek, při kterých byly pozorovány Soretovy pásy pro většinu forem iontu železa hemu těchto proteinů. Výrazné difference od vlnových délek, při kterých byly zjištěny oblasti Soretova pásu *EcDOS*, byly pozorovány zejména ve stavu Fe(III) proteinu *YddV* [54]. Soretův pás proteinu *YddV* v nativním stavu byl nalezen při 394 nm [54], zatímco Soretův pás proteinu *EcDOS* byl zjištěn při 417 nm. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben tím, že protein *YddV* v nativním stavu vytváří vysokospinové a pentakoordinované komplexy [54]. Jak již bylo uvedeno výše, protein *EcDOS* je však v nativním stavu hexakoordinovaný [62] podobně jako protein *AfGcHK* [80]. Dalo by se tedy předpokládat, že některé vlastnosti proteinu *AfGcHK* budou bližší vlastnostem proteinu *EcDOS*, ačkoli první zmíněný protein obsahuje sensorovou doménu s globinovou strukturou a druhý se strukturou PAS, než vlastnostem proteinu *YddV*, přestože má tento sensorový protein také globinovou strukturu sensorové domény jako *AfGcHK*.

V experimentální části této bakalářské práce byly úspěšně izolovány proteiny *EcDOS* a *EcDOS*-PAS. Protein *EcDOS*-PAS byl získán ve vysokém výtěžku i čistotě. V případě proteinu *EcDOS* došlo v průběhu afinitní chromatografie k jeho kontaminaci, ale i přesto byla dosažena čistota finálního preparátu tohoto proteinu až 90 %. Dále proběhla pilotní charakterizace obou proteinů. Naměřená UV/VIS absorpční spektra obou proteinů se velmi podobají analogickým údajům dostupným v literatuře. Během dalšího studia je v plánu pokračovat ve zkoumání mechanismu působení hemových sensorových proteinů. Jako možnost se nabízí studium vlivu inhibitorů [81], o nichž je známo, že působí na sensorové hemoproteiny s GAF doménou. Jejich vliv na hemové sensorové proteiny s PAS doménou zatím ještě studován nebyl.

## 7 Závěr

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem hemových sensorových proteinů, přesněji modelovým hemovým sensorovým proteinem, který detekuje kyslík, konkrétně proteinem *EcDOS*, a dále jeho zkrácenou formou, izolovanou sensorovou doménou s PAS strukturou (*EcDOS*-PAS). Stanovené cíle předkládané bakalářské práce byly naplněny, konkrétně bylo dosaženo níže uvedených výsledků:

1. Dosavadní výsledky vědeckých studií, které se týkají dané problematiky, jsou shrnuty na str. 13 až 34.
2. Protein *EcDOS* byl úspěšně exprimován v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) po indukci IPTG, což bylo doloženo SDS elektroforézou. Z 1 litru TB média bylo vyprodukováno 8,8 g buněk *E. coli* BL-21 (DE3), které obsahovaly daný protein.
3. Expres proteinu *EcDOS*-PAS v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) po indukci IPTG proběhla rovněž úspěšně. Z celkového objemu 2 litrů TB média bylo získáno 9,5 g buněk *E. coli* BL-21 (DE3), ve kterých byl exprimovaný protein *EcDOS*-PAS obsažen.
4. Z 8,8 g buněk *E. coli* BL-21 (DE3) obsahujících exprimovaný protein *EcDOS* byl daný hemoprotein úspěšně izolován. Bylo získáno 0,538 mg *EcDOS* z 1 litru TB média.
5. Z 9,5 g buněk *E. coli* BL-21 (DE3), které obsahovaly exprimovaný protein *EcDOS*-PAS, byl tento hemoprotein úspěšně izolován. Z 1 litru TB média bylo připraveno 3,613 mg proteinu *EcDOS*-PAS.
6. Výtěžek proteinu *EcDOS*-PAS na 1 litr TB média byl přibližně 6,7× vyšší než analogický výtěžek proteinu *EcDOS*. V případě výtěžků proteinů z jednoho gramu buněk *E. coli* BL-21 (DE3), byl tento výtěžek pro *EcDOS*-PAS dokonce 12,5× vyšší než pro *EcDOS*. Také čistota izolovaného preparátu *EcDOS*-PAS (99 %) byla výrazně vyšší v porovnání s finálním preparátem *EcDOS* (85–90 %). Soretovy pásy a Q-pásy  $\alpha$  a  $\beta$  absorpčních spekter obou proteinů v UV/VIS oblasti byly nalezeny při podobných hodnotách vlnových délek.

## Seznam použitých zdrojů

- [1] Igarashi, J.; Kitanishi, K.; Shimizu, T. 73 Emerging Roles of Heme as a Signal and a Gas-Sensing Site: Heme-Sensing and Gas-Sensing Proteins. *Handbook of Porphyrin Science*, 2011, 15, 399–460.
- [2] Delgado-Nixon, V. M.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M. A. Dos, a Heme-Binding PAS Protein from *Escherichia Coli*, Is a Direct Oxygen Sensor. *Biochemistry*, 2000, 39, 2685–2691.
- [3] Šípal, Z.; Anzenbacher, P.; Peč, P.; Pospíšil, J.; Růžicka, I. *Biochemie*; SPN: Praha, 1992.
- [4] Vodrážka, Z. *Biochemie*; Vyd. 1.; Academia: Praha, 1992.
- [5] Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*; 4th ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2011.
- [6] Fukuto, J. M.; Carrington, S. J.; Tantillo, D. J.; Harrison, J. G.; Ignarro, L. J.; Freeman, B. A.; Chen, A.; Wink, D. A. Small Molecule Signaling Agents: The Integrated Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Oxides, Oxides of Carbon, Dioxygen, Hydrogen Sulfide, and Their Derived Species. *Chemical Research in Toxicology*, 2012, 25, 769–793.
- [7] Fufezan, C.; Zhang, J.; Gunner, M. R. Ligand Preference and Orientation in B- and c-Type Heme-Binding Proteins. *Proteins*, 2008, 73, 690.
- [8] Murray, R. K. *Harperova biochemie*; H & H: Praha, 2002.
- [9] Liu, J.; Chakraborty, S.; Hosseinzadeh, P.; Yu, Y.; Tian, S.; Petrik, I.; Bhagi, A.; Lu, Y. Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron–Sulfur, or Copper Redox Centers. *Chemical Reviews*, 2014, 114, 4366–4469.
- [10] Poulos, T. L. Heme Enzyme Structure and Function. *Chemical reviews*, 2014, 114, 3919–3962.
- [11] Igarashi, K.; Watanabe-Matsui, M. Wearing Red for Signaling: The Heme-Bach Axis in Heme Metabolism, Oxidative Stress Response and Iron Immunology. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2014, 232, 229–253.
- [12] Girvan, H. M.; Munro, A. W. Heme Sensor Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288, 13194–13203.
- [13] Igarashi, J.; Kitanishi, K.; Martinkova, M.; Murase, M.; Iizuka, A.; Shimizu, T. The Roles of Thiolate-Heme Proteins, Other Than the P450 Cytochromes, in the Regulation of Heme-Sensor Proteins. *Acta Chimica Slovenica*, 2008, 8.
- [14] Zhang, L.; Guarente, L. Heme Binds to a Short Sequence That Serves a Regulatory Function in Diverse Proteins. *The EMBO Journal*, 1995, 14, 313–320.
- [15] *Proceedings of the 15th International Conference on Cytochromes P450: Biochemistry, Biophysics, and Functional Genomics: Bled, Slovenia, June 17-21, 2007*; Medimond, 2007.
- [16] Miksanova, M.; Igarashi, J.; Minami, M.; Sagami, I.; Yamauchi, S.; Kurokawa, H.; Shimizu, T. Characterization of Heme-Regulated EIF2alpha Kinase: Roles of the N-Terminal Domain in the Oligomeric State, Heme Binding, Catalysis, and Inhibition. *Biochemistry*, 2006, 45, 9894–9905.

- [17] Hargrove, M. S.; Singleton, E. W.; Quillin, M. L.; Ortiz, L. A.; Phillips, G. N.; Olson, J. S.; Mathews, A. J. His64(E7) -> Tyr Apomyoglobin as a Reagent for Measuring Rates of Hemin Dissociation. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269, 4207–4214.
- [18] Hargrove, M. S.; Barrick, D.; Olson, J. S. The Association Rate Constant for Heme Binding to Globin Is Independent of Protein Structure. *Biochemistry*, 1996, 35, 11293–11299.
- [19] Igarashi, J.; Murase, M.; Iizuka, A.; Pichierri, F.; Martinkova, M.; Shimizu, T. Elucidation of the Heme Binding Site of Heme-Regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$  Kinase and the Role of the Regulatory Motif in Heme Sensing by Spectroscopic and Catalytic Studies of Mutant Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283, 18782–18791.
- [20] Yang, J.; Ishimori, K.; O'Brian, M. R. Two Heme Binding Sites Are Involved in the Regulated Degradation of the Bacterial Iron Response Regulator (Irr) Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280, 7671–7676.
- [21] Hirai, K.; Martinkova, M.; Igarashi, J.; Saiful, I.; Yamauchi, S.; El-Mashtoly, S.; Kitagawa, T.; Shimizu, T. Identification of Cys385 in the Isolated Kinase Insertion Domain of Heme-Regulated EIF2 $\alpha$  Kinase (HRI) as the Heme Axial Ligand by Site-Directed Mutagenesis and Spectral Characterization. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2007, 101, 1172–1179.
- [22] Taniuchi, S.; Miyake, M.; Tsugawa, K.; Oyadomari, M.; Oyadomari, S. Integrated Stress Response of Vertebrates Is Regulated by Four EIF2 $\alpha$  Kinases. *Scientific Reports*, 2016, 6, 32886.
- [23] Chen, J.-J. Regulation of Protein Synthesis by the Heme-Regulated EIF2 $\alpha$  Kinase: Relevance to Anemias. *Blood*, 2007, 109, 2693–2699.
- [24] Shimizu, T.; Huang, D.; Yan, F.; Stranova, M.; Bartosova, M.; Fojtíková, V.; Martinková, M. Gaseous O<sub>2</sub>, NO, and CO in Signal Transduction: Structure and Function Relationships of Heme-Based Gas Sensors and Heme-Redox Sensors. *Chemical Reviews*, 2015, 115, 6491–6533.
- [25] Uchida, T.; Sato, E.; Sato, A.; Sagami, I.; Shimizu, T.; Kitagawa, T. CO-Dependent Activity-Controlling Mechanism of Heme-Containing CO-Sensor Protein, Neuronal PAS Domain Protein 2. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280, 21358–21368.
- [26] Derbyshire, E. R.; Marletta, M. A. Structure and Regulation of Soluble Guanylate Cyclase. *Annual Review of Biochemistry*, 2012, 81, 533–559.
- [27] Moskvina, O. V.; Kaplan, S.; Gilles-Gonzalez, M.-A.; Gomelsky, M. Novel Heme-Based Oxygen Sensor with a Revealing Evolutionary History. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 28740–28748.
- [28] Roberts, G. P.; Thorsteinsson, M. V.; Kerby, R. L.; Lanzilotta, W. N.; Poulos, T. CooA: A Heme-Containing Regulatory Protein That Serves as a Specific Sensor of Both Carbon Monoxide and Redox State. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2001, 67, 35–63.

- [29] Gilles-Gonzalez, M. A.; Ditta, G. S.; Helinski, D. R. A Haemoprotein with Kinase Activity Encoded by the Oxygen Sensor of *Rhizobium Meliloti*. *Nature*, 1991, 350, 170–172.
- [30] Tagliabue, L.; Antoniani, D.; Maciag, A.; Bocci, P.; Raffaelli, N.; Landini, P. The Diguanylate Cyclase YddV Controls Production of the Exopolysaccharide Poly-N-Acetylglucosamine (PNAG) through Regulation of the PNAG Biosynthetic PgaABCD Operon. *Microbiology (Reading, England)*, 2010, 156, 2901–2911.
- [31] Chang, A. L.; Tuckerman, J. R.; Gonzalez, G.; Mayer, R.; Weinhouse, H.; Volman, G.; Amikam, D.; Benziman, M.; Gilles-Gonzalez, M. A. Phosphodiesterase A1, a Regulator of Cellulose Synthesis in *Acetobacter Xylinum*, Is a Heme-Based Sensor. *Biochemistry*, 2001, 40, 3420–3426.
- [32] Martinková, M.; Kitanishi, K.; Shimizu, T. Heme-Based Globin-Coupled Oxygen Sensors: Linking Oxygen Binding to Functional Regulation of Diguanylate Cyclase, Histidine Kinase, and Methyl-Accepting Chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288, 27702–27711.
- [33] Heikaus, C. C.; Pandit, J.; Klevit, R. E. Cyclic Nucleotide Binding GAF Domains from Phosphodiesterases – Structural and Mechanistic Insights. *Structure (London, England: 1993)*, 2009, 17, 1551–1557.
- [34] Ho, Y.-S. J.; Burden, L. M.; Hurley, J. H. Structure of the GAF Domain, a Ubiquitous Signaling Motif and a New Class of Cyclic GMP Receptor. *The EMBO Journal*, 2000, 19, 5288–5299.
- [35] Tang, K.; Knipp, M.; Liu, B.-B.; Cox, N.; Stabel, R.; He, Q.; Zhou, M.; Scheer, H.; Zhao, K.-H.; Gärtner, W. Redox-Dependent Ligand Switching in a Sensory Heme-Binding GAF Domain of the *Cyanobacterium Nostoc* Sp. PCC7120. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290, 19067–19080.
- [36] Zoraghi, R.; Corbin, J. D.; Francis, S. H. Properties and Functions of GAF Domains in Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Other Proteins. *Molecular pharmacology*, 2004, 65, 267–278.
- [37] Cho, H. Y.; Cho, H. J.; Kim, Y. M.; Oh, J. I.; Kang, B. S. Structural Insight into the Heme-Based Redox Sensing by DosS from *Mycobacterium Tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284, 13057–13067.
- [38] Sivaramakrishnan, S.; Ortiz de Montellano, P. R. The DosS-DosT/DosR Mycobacterial Sensor System. *Biosensors*, 2013, 3, 259–282.
- [39] Kumar, A.; Deshane, J. S.; Crossman, D. K.; Bolisetty, S.; Yan, B.-S.; Kramnik, I.; Agarwal, A.; Steyn, A. J. C. Heme Oxygenase-1-Derived Carbon Monoxide Induces the *Mycobacterium Tuberculosis* Dormancy Regulon. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283, 18032–18039.
- [40] Sousa, E. H. S.; Tuckerman, J.R.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M.-A. DosT and DevS Are Oxygen-Switched Kinases in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 2007, 16, 1708–1719.
- [41] Kaur, K.; Taneja, N. K.; Dhingra, S.; Tyagi, J. S. DevR (DosR) Mimetic Peptides Impair Transcriptional Regulation and Survival of *Mycobacterium Tuberculosis*

- under Hypoxia by Inhibiting the Autokinase Activity of DevS Sensor Kinase. *BMC Microbiology*, 2014, 14, 195.
- [42] Walker, J. A.; Rivera, S.; Weinert, E. E. Mechanism and Role of Globin Coupled Sensor Signaling. *Advances in microbial physiology*, 2017, 71, 133–169.
  - [43] Taylor, B. L.; Zhulin, I. B. PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63, 479–506.
  - [44] Zhang, W.; Phillips, G. N. Structure of the Oxygen Sensor in *Bacillus Subtilis*: Signal Transduction of Chemotaxis by Control of Symmetry. *Structure*, 2003, 11, 1097–1110.
  - [45] Lecomte, J. T.; Vuletich, D. A.; Lesk, A. M. Structural Divergence and Distant Relationships in Proteins: Evolution of the Globins. *Current Opinion in Structural Biology*, 2005, 15, 290–301.
  - [46] Freitas, T. A. K.; Saito, J. A.; Hou, S.; Alam, M. Globin-Coupled Sensors, Protoglobins, and the Last Universal Common Ancestor. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, 99, 23–33.
  - [47] Hou, S.; Larsen, R. W.; Boudko, D.; Riley, C. W.; Karatan, E.; Zimmer, M.; Ordal, G. W.; Alam, M. Myoglobin-like Aerotaxis Transducers in Archaea and Bacteria. *Nature*, 2000, 403, 540–544.
  - [48] Stranava, M.; Man, P.; Skálová, T.; Kolenko, P.; Blaha, J.; Fojtikova, V.; Martínek, V.; Dohnálek, J.; Lengalova, A.; Rosůlek, M.; Shimizu, T.; Martínková, M. Coordination and Redox State-Dependent Structural Changes of the Heme-Based Oxygen Sensor AfGcHK Associated with Intraprotein Signal Transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292, 20921–20935.
  - [49] Henry, J. T.; Crosson, S. Ligand Binding PAS Domains in a Genomic, Cellular, and Structural Context. *Annual Review of Microbiology*, 2011, 65, 261–286.
  - [50] De Franceschi, N.; Wild, K.; Schlacht, A.; Dacks, J. B.; Sinning, I.; Filippini, F. Longin and GAF Domains: Structural Evolution and Adaptation to the Subcellular Trafficking Machinery. *Traffic*, 2014, 15, 104–121.
  - [51] Möglich, A.; Ayers, R. A.; Moffat, K. Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. *Structure (London, England: 1993)*, 2009, 17, 1282–1294.
  - [52] Shimizu, T. The Heme-Based Oxygen-Sensor Phosphodiesterase *Ec* DOS (DosP): Structure-Function Relationships. *Biosensors*, 2013, 3, 211–237.
  - [53] Hengge, R. Principles of c-di-GMP Signalling in Bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 2009, 7, 263–273.
  - [54] Kitanishi, K.; Kobayashi, K.; Kawamura, Y.; Ishigami, I.; Ogura, T.; Nakajima, K.; Igarashi, J.; Tanaka, A.; Shimizu, T. Important Roles of Tyr43 at the Putative Heme Distal Side in the Oxygen Recognition and Stability of the Fe(II)–O<sub>2</sub> Complex of YddV, a Globin-Coupled Heme-Based Oxygen Sensor Diguanylate Cyclase. *Biochemistry*, 2010, 49, 10381–10393.
  - [55] Tuckerman, J. R.; Gonzalez, G.; Sousa, E. H. S.; Wan, X.; Saito, J. A.; Alam, M.; Gilles-Gonzalez, M.-A. An Oxygen-Sensing Diguanylate Cyclase and

- Phosphodiesterase Couple for c-di-GMP Control. *Biochemistry*, 2009, 48, 9764–9774.
- [56] Park, H.; Suquet, C.; D Satterlee, J.; Kang, C. Insights into Signal Transduction Involving PAS Domain Oxygen-Sensing Heme Proteins from the X-Ray Crystal Structure of *Escherichia Coli* Dos Heme Domain (*Ec* DosH). *Biochemistry*, 2004, 43, 2738–2746.
- [57] Kurokawa, H.; Lee, D.-S.; Watanabe, M.; Sagami, I.; Mikami, B.; Raman, C. S.; Shimizu, T. A Redox-Controlled Molecular Switch Revealed by the Crystal Structure of a Bacterial Heme PAS Sensor. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279, 20186–20193.
- [58] Tanaka, A.; Takahashi, H.; Shimizu, T. Critical Role of the Heme Axial Ligand, Met95, in Locking Catalysis of the Phosphodiesterase from *Escherichia Coli* (*Ec* DOS) toward Cyclic Di-GMP. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 21301–21307.
- [59] Tanaka, A.; Shimizu, T. Ligand Binding to the Fe(III)-Protoporphyrin IX Complex of Phosphodiesterase from *Escherichia Coli* (*Ec* DOS) Markedly Enhances Catalysis of Cyclic Di-GMP: Roles of Met95, Arg97, and Phe113 of the Putative Heme Distal Side in Catalytic Regulation and Ligand Binding. *Biochemistry*, 2008, 47, 13438–13446.
- [60] Ishitsuka, Y.; Araki, Y.; Tanaka, A.; Igarashi, J.; Ito, O.; Shimizu, T. Arg97 at the Heme-Distal Side of the Isolated Heme-Bound PAS Domain of a Heme-Based Oxygen Sensor from *Escherichia Coli* (*Ec* DOS) Plays Critical Roles in Autoxidation and Binding to Gases, Particularly O<sub>2</sub>. *Biochemistry*, 2008, 47, 8874–8884.
- [61] Anzenbacher, P.; Marchal, S.; Palacký, J.; Anzenbacherová, E.; Domaschke, T.; Lange, R.; Shimizu, T.; Kitanishi, K.; Stranova, M.; Stiborová, M.; Martinkova, M. Pressure Effects Reveal That Changes in the Redox States of the Heme Iron Complexes in the Sensor Domains of Two Heme-Based Oxygen Sensor Proteins, *Ec*DOS and YddV, Have Profound Effects on Their Flexibility. *The FEBS journal*, 2014, 281, 5208–5219.
- [62] Sasakura, Y.; Hirata, S.; Sugiyama, S.; Suzuki, S.; Taguchi, S.; Watanabe, M.; Matsui, T.; Sagami, I.; Shimizu, T. Characterization of a Direct Oxygen Sensor Heme Protein from *Escherichia Coli*. Effects of the Heme Redox States and Mutations at the Heme-Binding Site on Catalysis and Structure. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277, 23821–23827.
- [63] MilliporeSigma (Novagen). pET-28a(+) Sequence and Map. Dostupné z URL: <[https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET\\_and\\_duet\\_vectors\\_\(novagen\)&plasmid=pET-28a\(+\)>](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET_and_duet_vectors_(novagen)&plasmid=pET-28a(+)>) [cit. 29. 9. 2019].
- [64] Novagen. PET-28a-c(+) Vectors TB074, 1998. Dostupné z URL: <<https://biochem.web.utah.edu/hill/links/pET28.pdf>> [cit. 29. 9. 2019].
- [65] Studier, F. W.; Moffatt, B. A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *Journal of Molecular Biology*, 1986, 189, 113–130.

- [66] Briand, L.; Marcion, G.; Kriznik, A.; Heydel, J. M.; Artur, Y.; Garrido, C.; Seigneuric, R.; Neiers, F. A Self-Inducible Heterologous Protein Expression System in *Escherichia Coli*. *Scientific Reports*, 2016, 6.
- [67] Blattner, F. R.; Plunkett, G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B.; Shao, Y. The Complete Genome Sequence of *Escherichia Coli* K-12. *Science*, 1997, 277, 1453–1462.
- [68] Stranova, M.; Martinek, V.; Man, P.; Fojtikova, V.; Kavan, D.; Vaněk, O.; Shimizu, T.; Martinkova, M. Structural Characterization of the Heme-Based Oxygen Sensor, *AfGcHK*, Its Interactions with the Cognate Response Regulator, and Their Combined Mechanism of Action in a Bacterial Two-Component Signaling System. *Proteins*, 2016, 84, 1375–1389.
- [69] Lengalova, A.; Fojtikova-Proskova, V.; Vavra, J.; Martínek, V.; Stranova, M.; Shimizu, T.; Martinkova, M. Kinetic Analysis of a Globin-Coupled Diguanylate Cyclase, YddV: Effects of Heme Iron Redox State, Axial Ligands, and Heme Distal Mutations on Catalysis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2019, 201, 110833.
- [70] Fojtikova, V.; Stranova, M.; Vos, M. H.; Liebl, U.; Hranicek, J.; Kitanishi, K.; Shimizu, T.; Martinkova, M. Kinetic Analysis of a Globin-Coupled Histidine Kinase, *AfGcHK*: Effects of the Heme Iron Complex, Response Regulator, and Metal Cations on Autophosphorylation Activity. *Biochemistry*, 2015, 54, 5017–5029.
- [71] Booth, W. T.; Schlachter, C. R.; Pote, S.; Ussin, N.; Mank, N. J.; Klapper, V.; Offermann, L. R.; Tang, C.; Hurlburt, B. K.; Chruszcz, M. Impact of an N-Terminal Polyhistidine Tag on Protein Thermal Stability. *ACS Omega*, 2018, 3, 760–768.
- [72] Gräslund, S.; Nordlund, P.; Weigelt, J.; Hallberg, B. M.; Bray, J.; Gileadi, O.; Knapp, S.; Oppermann, U.; Arrowsmith, C.; Hui, R.; Ming, J.; dhe-Paganon, S.; Park, H.; Savchenko, A.; Yee, A. Protein Production and Purification. *Nature methods*, 2008, 5, 135–146.
- [73] Heintz, U.; Meinhardt, A.; Winkler, A. Multi-PAS Domain-Mediated Protein Oligomerization of PpsR from *Rhodobacter Sphaeroides*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 2014, 70, 863–876.
- [74] Vojáčková, L. S. Příprava a Pilotní Charakterizace Přímého Kyslíkového Senzoru z Bakterie *E. Coli* (*EcDOS*). Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova: Praha, 2020.
- [75] Itoh, T.; Matsuura, S.-I.; Chuong, T. T.; Tanaike, O.; Hamakawa, S.; Shimizu, T. Successful Mesoporous Silica Encapsulation of Optimally Functional *EcDOS* (*E. Coli* Direct Oxygen Sensor), a Heme-Based O<sub>2</sub>-Sensing Phosphodiesterase. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 2019, 35, 329–335.



- [76] Khow, O.; Suntrarachun, S. Strategies for Production of Active Eukaryotic Proteins in Bacterial Expression System. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, 2, 159–162.
- [77] Lechauve, C.; Bouzahir-Sima, L.; Yamashita, T.; Marden, M. C.; Vos, M. H.; Liebl, U.; Kiger, L. Heme Ligand Binding Properties and Intradimer Interactions in the Full-Length Sensor Protein Dos from *Escherichia Coli* and Its Isolated Heme Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284, 36146–36159.
- [78] Sasakura, Y.; Yoshimura-Suzuki, T.; Kurokawa, H.; Shimizu, T. Structure–Function Relationships of EcDOS, a Heme-Regulated Phosphodiesterase from *Escherichia Coli*. *Accounts of Chemical Research*, 2006, 39, 37–43.
- [79] Kumar, A.; Toledo, J. C.; Patel, R. P.; Lancaster, J. R.; Steyn, A. J. C. *Mycobacterium Tuberculosis* DosS Is a Redox Sensor and DosT Is a Hypoxia Sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104, 11568–11573.
- [80] Kitanishi, K.; Kobayashi, K.; Uchida, T.; Ishimori, K.; Igarashi, J.; Shimizu, T. Identification and Functional and Spectral Characterization of a Globin-Coupled Histidine Kinase from *Anaeromyxobacter Sp.* Fw109-5. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286, 35522–35534.
- [81] Zheng, H.; Williams, J. T.; Aleiwi, B.; Ellsworth, E.; Abramovitch, R. B. Inhibiting *Mycobacterium Tuberculosis* DosRST Signaling by Targeting Response Regulator DNA Binding and Sensor Kinase Heme. *ACS Chemical Biology*, 2020, 15, 52–62.